DIE TOTALREKONSTITUTION DER 50S UNTEREINHEIT VON ESCHERICHIA COLI RIBOSOMEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ferdinand Dohme

aus Höfingen

1976

DIE TOTALREKONSTITUTION DER 50S UNTEREINHEIT VON ESCHERICHIA COLI RIBOSOMEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ferdinand Dohme

aus Höfingen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. H.-G. Wittmann

2. Referent: Prof. Dr. E.-R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 1976

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1. Chemikalien und Puffer	5
2.2. Isolierung der ribosomalen Untereinheiten	6
2.3. Darstellung einer RNS-freien S150 Oberstandsenzymfraktion	7
2.4. Vorbereitung der Initiationsfaktoren (IF)	9
2.5. Präparation und Analyse von LiCl-core Partikeln und split-Proteinfraktion von 50S Untereinheiten	11
2.6. Präparation des Gesamtproteins von 50S Untereinheiten (TP 50)	12
2.7. Isolierung von 23S RNS und 5S RNS aus 50S Untereinheiten	13
2.8. Rekonstitution der 50S Untereinheit	16
2.8.1. Partielle Rekonstitution	16
2.8.2. Totalrekonstitution	16
2.9. Strukturelle Untersuchungen	18
2.9.1. RNS-Gehalt	18
a) 23S RNS Bestimmung	18
b) 5S RNS Bestimmung	18
2.9.2. Protein-Gehalt	19
2.9.3. Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten (S)	19
2.10. Funktionelle Untersuchungen	20
2.10.1. Assoziationsverhalten mit 30S	20
2.10.2. R17-RNS abhängige Proteinsynthese	20
2.10.3. Poly(U) abhängige Poly(Phe)Synthese	22
2.10.4. Nichtenzymatische Translation	22
2.10.5. Untersuchung der t-RNS Bindung an das Ribosom	23
2.10.5.1. Enzymatische t-RNS-Bindung abhängig von:	23
a) Elongationsfaktor T	23
b) Initiationsfaktoren (IF)	24
2.10.5.2. Nichtenzymatische t-RNS-Bindung	24
a) in Abhängigkeit von Poly(U)	24
b) unter Alkoholbedingungen	25

Seite

2.10.6. Peptidyltransferaseaktivität 26

2.10.6.1. Puromycin-Reaktion mit enzymatisch gebundener t-RNS 26
2.10.6.2. Fragment-Test 26
2.10.6.3. Test mit Ac-Leucyl-t-RNS 27

2.10.7. Fragment-Bindung an das Ribosom 27
2.10.8. Antibiotika-Bindung 28
2.10.9. EF-G abhängige GTPase 28

3. Ergebnisse 30

3.1. Partielle Rekonstitution 30
3.2. Einstufige Totalrekonstitution 32

3.2.1. Allgemeines 32
3.2.2. Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen 35

3.2.2.1. Mg^{++}-Konzentration 35
3.2.2.2. NH_4Cl-Konzentration und andere monovalente Salze 37
3.2.2.3. Inkubationstemperatur 39
3.2.2.4. Inkubationsdauer 39
3.2.2.5. Zusatz von energiereichen Verbindungen und S150 Oberstandsenzymen 40
3.2.2.6. Einfluß der 30S Untereinheit 41
3.2.2.7. Zusatz von Polyaminen 44
3.2.2.8. Wirkung von Ribonucleasehemmern 45

3.3. Zweistufige Totalrekonstitution 46

3.3.1. Stufenweise Zugabe von Proteinen 47
3.3.2. Stufenweise Veränderung der Ionen- und Inkubationsbedingungen 48
3.3.3. Optimierung des pH-Wertes 51
3.3.4. Bestimmung der Inkubationszeiten 53
3.3.5. Vergleich der R50S mit nativen Untereinheiten 54
3.3.6. Verfeinerung der Rekonstitutionstechnik 57

3.4. Zweistufige Rekonstitution von ribosomalen 50S Untereinheiten anderer E.coli Stämme 62
3.5. Rekonstitutionsfähigkeit der ribosomalen Proteine in Abhängigkeit vom Erntepunkt der Bakterienzellen 65
3.6. Rekonstitution von RNS und Proteinen der 50S Untereinheiten von Bacillus stearothermophilus 70

Seite

3.7. *In vitro* Aufbau der 50S Untereinheit von E.coli Ribosomen 72

3.7.1. Analyse der ersten Rekonstitutionsstufe 73
3.7.2. Untersuchung des zweiten Rekonstitutionsschritts 75
3.7.3. Isolierung und Charakterisierung der RI_{50}-Partikel 79
3.7.4. Rekonstitution von 23S RNS mit Proteinen ohne 5S RNS-Zugabe 87

3.8. Isolierung von verschiedenen 5S RNS-Proteinkomplexen 92
3.9. Komponenten, die für die Konformationsänderung von $RI_{50}(1)$ nach $RI^{*}_{50}(1)$ während des ersten Rekonstitutionsschritts notwendig sind 94
3.10. Vergleichende Untersuchungen von zweistufig rekonstituierten Partikeln aus 23S RNS und TP 50 mit und ohne 5S RNS 105

3.10.1. Bestimmung des 5S RNS-Gehalts 106
3.10.2. Proteingehalt der (-5S RNS)-Partikel 108
3.10.3. Funktionelle Untersuchungen 109

3.10.3.1. Assoziation mit 30S Untereinheiten 109
3.10.3.2. Translationsfähigkeit 112
3.10.3.3. t-RNS Bindung 113
3.10.3.4. Peptidyltransferase 115
3.10.3.5. EF-G abhängige GTP-Spaltung 115

4. Diskussion 117

4.1. Partielle Rekonstitution 117
4.2. Einstufige Totalrekonstitution 117
4.3. Zweistufige Totalrekonstitution 118
4.4. *In vitro* Aufbau der 50S Untereinheit 121
4.5. 5S RNS-Proteinkomplexe 127
4.6. Rekonstitution von 23S RNS mit Proteinen ohne 5S RNS 128
4.7. Bedeutung von 5S RNS für die Bildung der 50S Partikel und für ribosomale Funktionen 128

5. Zusammenfassung 134

Literaturverzeichnis 136

ABKÜRZUNGEN:

RNS	Ribonucleinsäure
30S	die kleine ribosomale Untereinheit
50S	die große ribosomale Untereinheit
R50S	rekonstituierte 50S-Untereinheit
RI_{50}	Rekonstitutionszwischenprodukt des R50S
TP 50	Gesamtprotein der 50S Untereinheit
L1-L34	die Proteine der großen Untereinheit
4,0c	core-Partikel, das durch Waschen von 50S mit 4,0 M LiCl entstanden ist
4,0c HAC	durch Essigsäureextraktion gewonnene Proteine des 4,0c cores
sp 4,0	split-Proteine; die Proteinfraktion im Überstand nach Ultrazentrifugation der 4,0c core-Partikel
IF	Initiationsfaktoren 1, 2 + 3
EF-T	Elongationsfaktoren Tu + Ts
EF-G	Elongationsfaktor G
ATP	Adenosintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Poly-U	Poly-Uridylsäure
Phe	L-Phenylalanin
PEG	Polyäthylenglykol 6000
SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz
2D	zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
cpm	Radioaktivität in counts per minute

1. Einleitung

Ribosomen sind die kleinsten organisierten Zellorganellen. Sie stellen die Orte der Proteinbiosynthese in jeder lebenden Zelle dar. Man unterscheidet die Ribosomen nach ihrem Sedimentationsverhalten:
80S Ribosomen kommen im Cytoplasma von Eukaryonten vor und bestehen je zur Hälfte aus Ribonucleinsäure (RNS) und Proteinen. Bei niedrigen Mg^{++}-Ionenkonzentrationen zerfallen sie in eine große 60S Untereinheit und eine kleinere 40S Untereinheit.
70S Ribosomen findet man in Prokaryonten und in den Chloroplasten von Eukaryonten. Sie enthalten etwa zu zwei Drittel RNS und ein Drittel Proteine. Ihre Untereinheiten haben Sedimentationskoeffizienten von 50S und 30S.
55S Ribosomen sind in den Mitochondrien von Eukaryonten enthalten. Sie bestehen zu 40 % aus RNS und zu 60 % aus Proteinen.

Die meisten Erkenntnisse über Ribosomen liegen aus Untersuchungen an den Ribosomen des Bakteriums Escherichia coli vor. Die große 50S Untereinheit setzt sich aus 34 verschiedenen Proteinen (L1 - L34) und 2 RNS Molekülen zusammen, einer großen 23S RNS und einer kleinen 5S RNS; die 30S Untereinheit besitzt 21 Proteine (S1 - S21) und ein 16S RNS Molekül.

Alle ribosomalen Proteine sind isoliert und charakterisiert worden (Obersicht: Wittmann, 1974). Die Aminosäuresequenzen von 15 der 55 Proteine sind bestimmt, und 18 weitere Proteine sind teilweise sequenziert worden (Obersicht: Wittmann&Wittmann-Liebold, 1974). Die Reihenfolge der 120 Nukleotide der 5S RNS und von

80 - 90 % der 1.600 Nukleotide der 16S RNS sind bekannt (Brownlee, Sanger & Barrell, 1968; Ehresmann et al, 1975). Die Aufklärung der Nucleotidsequenz der 3.200 Bausteine der 23S RNS ist ebenfalls im Gange.

Die Proteinsynthese besteht in der geordneten Übersetzung der an der Desoxyribonucleinsäure (DNS) transkribierten messenger-RNS in eine bestimmte Aminosäurefolge. Sie wird durch den Ablauf einer Vielzahl von Teilfunktionen an den ribosomalen Untereinheiten ermöglicht.

Ein wichtiges Problem der Ribosomenforschung stellt die Korrelation der bekannten Strukturelemente mit den verschiedenen Partialfunktionen dar. Einige experimentelle Ansätze waren bei der Aufklärung der Beziehung von Struktur und Funktion des Ribosoms von besonderem Wert:
Antibiotika hemmen spezifisch einen Funktionsschritt am Ribosom. Resistente Bakterien enthalten veränderte Ribosomen, und so kann die gehemmte ribosomale Funktion dem veränderten Strukturelement zugeordnet werden; z.B. wird die Resistenz gegen Streptomycin durch einen Aminosäureaustausch in Protein S12 hervorgerufen (Ozaki, Mizushima & Nomura, 1969; Funatsu & Wittmann, 1972).

Antikörper, die spezifisch gegen ein ribosomales Protein gerichtet sind, beeinträchtigen einen bestimmten Funktionsschritt. Protein und Partialfunktion können korreliert werden; z.B. inhibiert Anti L7/L12 die Bindung der Elongationsfaktoren an das Ribosom (Highland et al, 1973).

Die Rekonstitution des Ribosoms aus seinen molekularen Bestandteilen ermöglicht im besonderen ein genaueres Verständnis seiner Struktur und Funktionsweise.

Traub und Nomura (1968) war es schon 1968 gelungen, die 30S Untereinheit des E.coli Ribosoms in ihre Nucleinsäure- und Proteinkomponenten zu zerlegen und im Reagenzglas bei bestimmten Inkubationsbedingungen wiederherzustellen. Mittels der Rekonstitutionstechnik konnten u.a. Proteine bestimmt werden, die bei der t-RNS Bindung an die 30S Untereinheit beteiligt sind (Nomura et al, 1969; Randall - Hazelbauer & Kurland, 1972). Die Analyse der Rekonstitution führte zur Aufstellung einer "assembly map", die die Reihenfolge der Anlagerung der Proteine an die 16S RNS beschreibt und Aufschlüsse über die Nachbarschaftsverhältnisse innerhalb des Ribosoms gibt (Mizushima & Nomura, 1970).

Die große 50S Untereinheit, die für die wichtigen enzymatischen Prozesse bei der Proteinsynthese wie Peptidyltransferase und GTP-Spaltung verantwortlich ist, kann jedoch unter den 30S-Bedingungen nicht rekonstituiert werden (Nomura, 1973).

Maruta et al (1971) beschrieben eine komplizierte Methode für die Totalrekonstitution der 50S Untereinheit, die aber in anderen Laboratorien nicht zu verifizieren war (Nomura, 1973; Chu & Maeba, 1973).
Bisher konnte das E.coli 50S Ribosom nur teilweise rekonstituiert werden. Diese partielle Rekonstitution, bei der die Untereinheit in eine Proteinfraktion und einen Ribonucleoprotein-Komplex dissoziiert und in vitro wiederhergestellt wird (Staehelin & Meselson, 1966), ermöglichte u.a. die Identifizierung von Proteinen im Peptidyltransferasezentrum und von einem Protein, das an der Chloramphenicolbindung beteiligt ist (Nierhaus & Montejo, 1973; Moore et al, 1975; Nierhaus & Nierhaus, 1973).

Nomura und Erdmann (1970) konnten die ribosomale 50S Untereinheit des thermophilen Bacillus stearothermophilus rekonstituieren. Diese Methode war jedoch bei E.coli Ribosomen nicht anwendbar.

Da die Mehrzahl aller biochemischen und genetischen Daten über prokaryontische Ribosomen von E.coli stammen, blieb die Totalrekonstitution der großen Untereinheit von hervorragendem Interesse.

In dieser Arbeit wird eine Methode beschrieben, die die Totalrekonstitution der 50S Untereinheit von E. coli Ribosomen ermöglicht. Die rekonstituierten Partikel wurden einer Reihe von strukturellen und funktionellen Untersuchungen unterworfen und im Vergleich zu nativen Untereinheiten getestet. Diese Technik ist bei der Rekonstitution von Ribosomen aus verschiedenen E.coli Stämmen anwendbar und erweist sich auch bei B.stearothermophilus 50S Untereinheiten als vorteilhaft. Der Verlauf des in vitro Aufbaus der 50S Untereinheiten wurde analysiert und die während der Rekonstitution auftretenden Zwischenprodukte isoliert und charakterisiert. Ferner wurden Partikel hergestellt, die nur aus einer der zwei RNS-Arten (23S RNS oder 5S RNS) und Proteinen bestehen, und es wird die Bedeutung der 5S RNS in Partialfunktionen der 50S Untereinheit untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Puffer

(^{3}H)-Leucin (47 Ci/m mol), (^{14}C)-Valin (33 Ci/mol) und γ-(^{32}P)-Guanosintriphosphat (10 Ci/m mol) wurden von New England Nuclear, Boston, und (^{14}C)-Phenylalanin (0,46 Ci/m mol) und (^{14}C)-Chloramphenicol (4.9 Ci/mol) von Amersham/Buchler, Braunschweig, bezogen. Bentonite SF und Natriumdodecylsulfat wurden bei Serva, Heidelberg, und Polyäthylenglycol 6000 bei Merck-Schuchardt, Höhenbrunn, gekauft. Die Polyamine Spermin, Spermidin und Putrescin stammen von Sigma, St. Louis, Chlortetracyclin von Calbiochem, San Diego, und Instagel von Packard, Downers Grove, USA. Desoxyribonuclease I (E.C.3.1.4.5.), Ribonuclease A (E.C.2.7.7.16.), t-RNS aus E.coli und Poly-Uridylsäure wurden bei Boehringer, Mannheim, erworben. Herr Norbert Ulbrich, Berlin, stellte die Elongationsfaktoren Tu + Ts, Herr Dr. K. von Meyenburg, Kopenhagen, den Elongationsfaktor G und Herr Dr. Richard Brimacombe, Berlin, (^{3}H)-markierte 50S Untereinheiten zur Verfügung.

Folgende Puffer wurden verwendet:

PO_4^--Puffer:	10 mM K_2HPO_4-KH_2PO_4 (pH 7.6)
	1 mM $MgCl_2$
	6 mM Mercaptoäthanol
TM-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
	10 mM MgAc
	0,5mM EDTA

TM4-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
	4 mM MgAc
	0,2mM EDTA
S-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
	10 mM MgAc
	6 mM Mercaptoäthanol
TMNSH-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
	60 mM NH_4Cl
	10 mM MgAc
	6 mM Mercaptoäthanol
Rekonstitutions-puffer:	20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
	400 mM NH_4Cl
	4 bzw. 20 mM MgAc
	0,2 bzw. 1 mM EDTA
	2 mM Mercaptoäthanol

2.2. Isolierung der ribosomalen Untereinheiten

In früher logarithmischer Wachstumsphase geerntete Zellen von Escherichia coli K12, Stamm A19 (RNase I^-; Gesteland, 1966) wurden in PO_4^--Puffer mit DNase (1 µg/ml) gewaschen und mit Aluminiumoxyd (Alcoa) zerrieben. Der Rohextrakt wurde durch zweimalige Zentrifugation (10 Min, 40 Min; je bei 30.000 g) von Zellfragmenten und Alcoa befreit. Aus dem Oberstand wurden die Ribosomen durch Ultrazentrifugation (6 Std / 150.000 g) sedimentiert und in PO_4^--Puffer resuspen-

diert. Sie wurden nach anschließender zweimaliger Dialyse gegen PO_4^--Puffer durch Zonalzentrifugation (7.000 A_{260}-Einheiten pro Lauf) in ihre Untereinheiten getrennt (Nierhaus et al, 1973). Die 30S und 50S enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, bei 10 mM Mg Ac in 10 % PEG_{6000} ausgefällt (30 Min/ 0^oC) (Expert - Besançon et al, 1975), abzentrifugiert (30 Min/ 30.000 g) und in TMNSH-Puffer aufgenommen (200-400 A_{260}-Einheiten/ml).

Die Reinheit der Untereinheiten wurde im Poly-U abhängigen Poly(Phe)-Synthesesystem getestet, die Verunreinigung war ≤ 3 %.

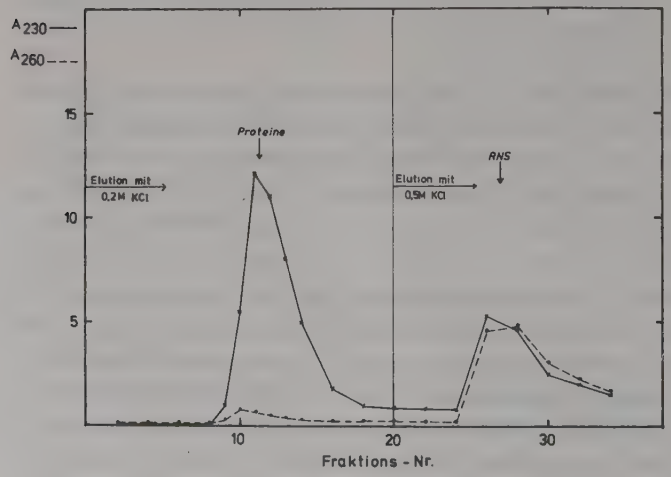
2.3. Darstellung einer RNS-freien S150 Oberstandsenzymfraktion

Der Oberstand nach der Ultrazentrifugation bei der Ribosomengewinnung enthielt freie RNS und den Großteil der löslichen Zellenzyme. Nach einem zweiten Schritt zur Entfernung von Ribosomen (5 Std/150.000 g) wurde die sogenannte S-150 Fraktion gegen S-Puffer dialysiert.

Um eine Trennung der Enzyme von der RNS zu ermöglichen, wurde die S-150 Fraktion nach Dialyse gegen 6 M Harnstoff und 0,15 M KCl enthaltenden S-Puffer (6 Std/0^oC) auf eine mit dem gleichen Puffer zuvor äquilibrierte DEAE-Ionenaustauscher-Säule (2 cm mal 25 cm) aufgetragen. Die Proteine wurden mit 0,2 M KCl in 6 M Harnstoff-S-Puffer eluiert, und anschließend wurde die RNS mit 0,5 M KCl in 6 M Harnstoff-S-Puffer

aus der Säule entfernt (Abb. 1). Nach Dialyse gegen S-Puffer wurden die Proteine mit 5 Volumen vorgekühltem Aceton (-20°C) ausgefällt, abzentrifugiert (30 Min/30.000 g) und in S-Puffer resuspendiert. Das $A_{260}:A_{280}$ Verhältnis der S-150 DEAE Fraktion betrug ungefähr 1, was auf eine weitgehende Befreiung der Proteine von RNS schließen ließ.

Abb. 1: DEAE-Cellulose Säulenchromatographie der S-150 Enzymfraktion. Die Absorption der einzelnen Fraktionen wurden bei 230 nm (x ——— x) und 260 nm (• ----- •) Wellenlänge bestimmt, um die Unterscheidung von Protein- und RNS enthaltenden Fraktionen zu ermöglichen.

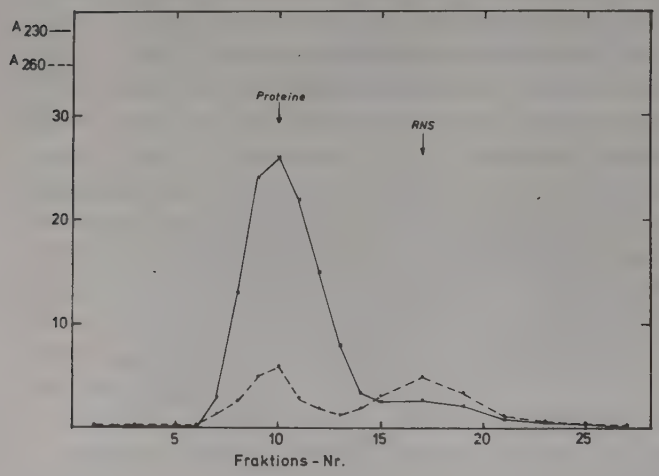


2.4. Vorbereitung der Initiationsfaktoren (IF)

Die Ribosomen wurden nach der Ultrazentrifugation in einem 1 M NH_4Cl-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 1 M NH_4Cl, 6 mM Mercaptoäthanol) durch ständiges Rühren gelöst (1 ml/1g Ribosom). Die Ribosomen wurden anschließend sedimentiert (4 Std/150.000 g). Im Oberstand befanden sich nun die durch die NH_4Cl-Behandlung vom Ribosom abgewaschenen Initiationsfaktoren. Zur vollständigen Entfernung der Ribosomen wurde die Oberstandsfraktion ein zweites Mal zentrifugiert (4 Std/150.000 g) und die oberen zwei Drittel des Oberstands gegen TEDGN-0,1-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4,0,1 M NH_4Cl, 1 mM EDTA, 0,5 mM Dithioerythrit, 15 % Glycerin) dialysiert. Für eine Trennung der Initiationsfaktoren von löslicher RNS wurde der Oberstand nach Dialyse gegen TEDGN-0,25-Puffer (wie TEDGN-0,1, aber 0,25 M NH_4Cl) auf eine in dem gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Säule (1 cm mal 6 cm) aufgetragen. Mit 0,3 M NH_4Cl-enthaltenden TEDGN-Puffer wurden zunächst die Proteine und schließlich die lösliche RNS eluiert (s. Abb. 2).

Die Fraktionen mit den Proteinen wurden gesammelt und gegen TEDGN-0,1-Puffer dialysiert. Das $A_{260}:A_{280}$ Verhältnis der Initiationsfaktorenfraktion war kleiner als 1, woraus zu schließen ist, daß sich keine RNS in der Proteinfraktion befand.

Abb. 2: DEAE-Cellulose Säulenchromatographie der Initiationsfaktoren



Das Eluat wurde fraktioniert; die Absorptionen wurden bei 230 nm (x ——— x) und 260 nm (• --- •) bestimmt. Die Protein- bzw. RNS enthaltenden Fraktionen sind gekennzeichnet.

2.5. Präparation und Analyse von LiCl-core Partikeln und Split-Proteinfraktion von 50S Untereinheiten

Nach einer Hitzeaktivierung (15 Min/37°C) wurden 50S Partikel fünf Stunden bei 0°C in 0,4 -8 M LiCl in TM-Puffer (15 A_{260}-Einheiten/ml) inkubiert (Homann & Nierhaus, 1971).

Durch anschließende Ultrazentrifugation (5 Std/ 150.000 g) konnten core-Partikel als Sediment und split-Proteine als Oberstand voneinander getrennt werden.

Die cores wurden in Rekonstitutionspuffer aufgenommen und mittels 2D-Gelelektrophorese (Kaltschmidt & Wittmann, 1970) auf ihren Proteingehalt untersucht.

Der Oberstand wurde gegen TM-Puffer dialysiert und lyophilisiert, anschließend in Aquabidest (200-500 Äquivalenzeinheiten (eU)/ml) gelöst und durch Essigsäureextraktion von RNS befreit (Zugabe von 2 Volumen Eisessig, 45 Min Inkubation bei 0°C und Sedimentierung der RNS durch Zentrifugation (30 Min/30.000 g)). Nach Zugabe von 5 Volumen vorgekühltem (-20°C) Aceton fielen die im Oberstand befindlichen Proteine aus; sie wurden abzentrifugiert, anschließend in Aquabidest (200-400 eU/ml) aufgenommen, mit 1 M ungepufferter Tris-Lösung auf pH 6 eingestellt und zweimal 45 Min gegen TM 4-Puffer dialysiert (sp-Proteine). Für eine präparative Trennung wurden die Proteine nach der Essigsäureextraktion gegen TM 4-Puffer mit 6 M Harnstoff dialysiert (6 Std/4°C) und auf eine Sephadex G-100-Säule aufgetragen (2cm mal 200 cm; äquilibriert mit 6 M Harnstoff in TM 4-Puffer). Die nach der Gelfiltration erhaltenen Fraktionen wurden gegen TM 4-Puffer dialysiert, zur Konzentrierung lyophilisiert,

in Aquabidest aufgenommen und wieder gegen TM 4-Puffer dialysiert. Ein konstantes Aliquot jeder Fraktion wurde in der ersten Dimension der 2 D-Gelelektrophorese auf ihren Proteingehalt untersucht.

2.6. Präparation des Gesamtproteins von 50S Untereinheiten (TP 50)

Nach einer Hitzeaktivierung (15 Min/37°C) wurden die 50S Partikel für 45 Min bei 0°C unter ständigem Rühren in 66 % Eisessig und 0,1 M MgAc inkubiert (Hardy et al, 1969). Die RNS präzipitierte und wurde abzentrifugiert (30 Min/30.000 g). Durch Zugabe von 5 Volumen vorgekühltem (-20°C) Aceton wurden die Proteine aus dem Überstand gefällt und sedimentiert (30 Min/30.000 g). Sie wurden in Aquabidest (200 eU/ml) wiederaufgenommen, mit 1 M Tris-Lösung stufenweise (je Stufe 1/100 Volumen Tris-Lösung) auf pH 6 eingestellt und zweimal 45 Min gegen 6 M Harnstoff enthaltenden TM 4-Puffer dialysiert. Die Proteinlösung wurde anschließend zweimal 45 Min gegen ein 500faches Volumen TM 4-Puffer und zweimal 45 Min gegen ein 500faches Volumen 0,01 % Essigsäure in TM 4-Puffer (pH 6) dialysiert. Der leicht saure pH-Wert von 6 verbesserte die Löslichkeit der zum großen Teil basischen ribosomalen Proteine und verhinderte ihr Ausfallen.

Das $A_{230}:A_{260}:A_{280}$ Verhältnis der TP50 betrug 5:1:1, was auf keine Verunreinigung der Proteine durch RNS hinwies.

Bei dieser Proteinpräparation wurde die RNS verworfen; das Sediment nach der Essigsäureextraktion war unlöslich. Sollten aus denselben 50S Untereinheiten sowohl Proteine als auch RNS gewonnen werden, so wurde mit der LiCl-Harnstoff-Methode (verändert nach Nomura & Erdmann, 1970) gearbeitet. Die 50S Partikel wurden nach der Hitzeaktivierung für 48 Std. bei 0°C in 2 M LiCl-4 M Harnstoff enthaltenden TM-Puffer gehalten. Die ausgefallene RNS wurde abzentrifugiert (15 Min/15.000 g). Der Oberstand wurde entweder dreimal 45 Min gegen TM 4-Puffer dialysiert (TP 50 Li) oder zur vollständigen Befreiung von RNS-Resten einer Essigsäureextraktion (s.o.) unterzogen. Die sedimentierte RNS wurde in TM 4-Puffer resuspendiert und mittels Phenolisierung (s.u.) von Proteinresten befreit.

2.7. Isolierung von 23S RNS und 5S RNS aus 50S Untereinheiten

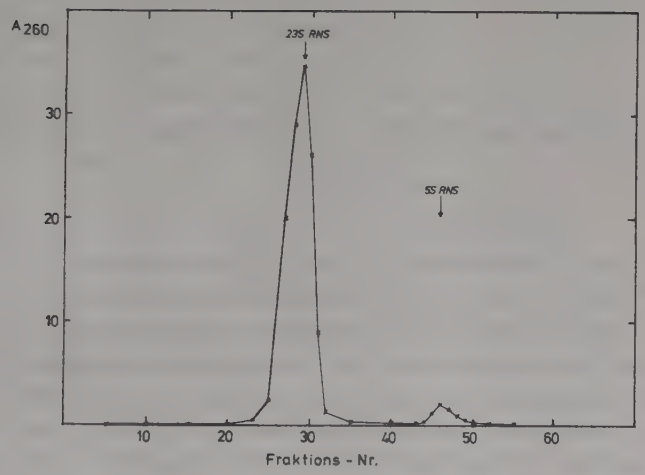
Die Isolierung der RNS erfolgte durch wiederholte Phenolextraktion: Destilliertes Phenol wurde im Kältelabor dreimal (einmal 1 Vol.; zweimal je 0,3 Vol.) mit 0,3 M K-Ph-Puffer (KH_2PO_4-K_2HPO_4,pH 7.5) und danach dreimal mit 0,3 Volumen SSC-EDTA (150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, 10 mM EDTA; pH 7.5) geschüttelt. Das so behandelte Phenol wurde bei -20°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde 1/20 Volumen 1 M ungepufferte Trislösung hinzugesetzt (Phenol-SSC-EDTA/Tris).

Bei der Extraktion wurden zu 50S Untereinheiten ($\leq$ 400 A_{260}-Einheiten/ml) 1/10 Vol 10 % SDS, 1/20 Vol 2 % Bentonite SF und 1,2 Vol Phenol-SSC-EDTA/Tris gegeben, bei 4°C 8 Min geschüttelt und zur Phasentrennung

zentrifugiert (10 Min/15.000 g). Die wäßrige Phase wurde wieder mit 1,2 Vol. Phenol-SSC-EDTA/Tris gemischt und bei 4°C 5 Min geschüttelt. Nach der Zentrifugation wurde die Extraktion ein drittes Mal wiederholt. Durch Zugabe von 2 Vol. vorgekühltem (-20°C) Äthanol in 20 mM Tris-HCl pH 7.8 wurde die RNS aus der wäßrigen Phase präzipitiert (15 Std/-20°C). Nach der Zentrifugation (45 Min/16.000 g) wurde sie in sterilem TM 4-Puffer resuspendiert (200-400 A_{260}-Einheiten/ml) und zur Entfernung von Phenolresten dreimal 45 Min gegen TM 4-Puffer dialysiert. Die nach der LiCl- Harnstoff-Methode gewonnene RNS wurde ebenfalls in sterilem TM 4-Puffer aufgenommen und dialysiert oder, um sie vollständig von Proteinen zu befreien, der beschriebenen dreimaligen Phenolextraktion unterworfen.

Für eine präparative Trennung von 23S RNS und 5S RNS wurde die Äthanol-gefällte RNS in sterilem RNS-Säulenpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 50 mM KCl; 1 % Methanol) resuspendiert (500 A_{260}-Einheiten/ml) und mit 1/10 Volumen steriler 60 %iger Sucrose versetzt. Die RNS-Sucrose-Lösung wurde auf eine Sephadex-G-100 Säule (3cm mal 200 cm; äquilibriert mit RNS-Säulenpuffer; $\sim$3000 A_{260} RNS pro Lauf) aufgetragen (Wrede & Erdmann, 1973). Der Durchfluß wurde fraktioniert (8 ml/Fraktion) und die Absorption bei 260 nm gemessen (Abb. 3).

Abb. 3: Trennung von 23S RNS und 5S RNS



Nach der Gelfiltration (Sephadex-G 100) wurde die Absorption bei 260 nm der einzelnen Fraktionen gemessen.

Die 23S RNS bzw. 5S RNS enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, die RNS mit 2 Vol Äthanol ausgefällt (s.o.) und nach der Zentrifugation in sterilem TM 4-Puffer aufgenommen (23S: 200-400 A_{260}-Einheiten/ml; 5S RNS: 40 A_{260}-Einheiten/ml).

Alle präparativen Arbeiten (Isolierung der ribosomalen Untereinheiten und core-Partikel; Vorbereitung von RNS und Proteinen) wurden, wenn nicht anders beschrieben, in sterilen Gefäßen bei 4°C im Kältelabor durchgeführt. Sowohl die Ribosomen und die core-Partikel als auch RNS und Proteine wurden sofort nach ihrer Gewinnung strukturell und funktionell untersucht, in kleine Por-

tionen verteilt (0,2 - 1 ml) und in einem Aceton/ Trockeneis-Gemisch bei -70°C eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.8. Rekonstitution der 50S-Untereinheit

2.8.1. Partielle Rekonstitution

Die partielle Rekonstitution erfolgte verändert nach der Methode von Nierhaus und Montejo (1973).

2,5 A_{260}-Einheiten core-Partikel in 20 µl Rekonstitutions-Puffer wurden mit 8 µl eines Rekonstitutionsgemischs (80 mM Tris-HCl pH 7.6; 4 M NH_4Cl, 160 mM MgAc, 8 mM EDTA, 20 mM Mercaptoäthanol) und 75 µl Proteinen in TM 4-Puffer (isolierte Proteine, Säulenfraktionen, split-Proteine oder Totalprotein TP 50) vermischt und für 90 Min bei 50°C inkubiert. Die Endkonzentrationen entsprachen mit 20 mM Tris-HCl pH 7.6; 400 mM NH_4Cl, 20 mM MgAc, 1 mM EDTA und 2 mM Mercaptoäthanol Rekonstitutionspufferbedingungen. 80 µl des Inkubationsgemisches entsprechend 2 Äquivalenzeinheiten (eU) rekonstituierter 50S Untereinheiten (R50S) wurden anschließend auf Poly(Phe)-Synthese- und Peptidyltransferaseaktivität geprüft.

2.8.2. Totalrekonstitution

Die einstufige Totalrekonstitution wurde unter den gleichen Ionen- und Inkubationsbedingungen wie bei der partiellen Rekonstitution durchgeführt.

2,5 A_{260}-Einheiten 23S RNS und 0,1 A_{260}-Einheiten 5S RNS in 20 µl TM 4-Puffer wurden mit 10 µl Totalrekonstitutionsgemisch (110 mM Tris-HCl pH 7.6, 4 M NH_4Cl, 4 mM MgAc, 0,2 mM EDTA, 20 mM Mercaptoäthanol) vermischt, anschließend wurden 4 µl 400 mM MgAc und 3-4 Äquivalenzeinheiten (eU) TP 50 in 70 µl TM 4-Puffer hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 90 Min bei 50°C wurden 80 µl (2 eU R50S) im Funktionstest verwandt.

In der zweistufigen Totalrekonstitution wurden bei kleinen Ansätzen 2,5 A_{260}-Einheiten 23S RNS und 0,1 A_{260}-Einheiten 5S RNS in 20 µl TM 4-Puffer mit 10 µl Totalrekonstitutionsgemisch (s.o.) und 3-4 eU TP 50 im Gesamtvolumen von 100 µl vermischt. Die Endkonzentrationen betrugen darum 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 400 mM NH_4Cl, 4 mM MgAc, 0,2 mM EDTA und 2 mM Mercaptoäthanol. Nach einer ersten Inkubation von 20 Min bei 44°C wurden 4 µl 400 mM MgAc hinzugegeben und damit die MgAc-Konzentration auf 20 mM erhöht. Es folgte eine zweite Inkubation (90 Min/50°C), und schließlich wurden 80 µl des inkubierten Gemisches bei der Funktionsanalyse eingesetzt.

Bei größeren Ansätzen wurden je nach Fragestellung 50-3000 A_{260}-Einheiten RNS unter den gleichen Bedingungen (25 A_{260}-Einheiten RNS/ml Rekonstitutionsansatz) mit Proteinen rekonstituiert. Unlösliche Produkte wurden nach der zweistufigen Inkubation abzentrifugiert (15 Min/30.000 g). Die Rekonstitutionspartikel wurden anschließend aus dem Oberstand durch Ultrazentrifugation oder PEG-6000 Fällung (siehe Beschreibung im Text) isoliert und in Rekonstitutions-Puffer oder TMNSH aufgenommen (200 A_{260}-Einheiten/ml).

2.9. Strukturelle Untersuchungen

2.9.1. RNS-Gehalt

a) 23S RNS Bestimmung

Durch 1D-Gelelektrophorese nach Ceri und Maeba (1973) wurde der 23S RNS-Gehalt von Rekonstitutionspartikeln und nativen 50S Untereinheiten untersucht. Je 1 A_{260}-Einheit Partikel oder isolierte 23S RNS wurde in 1 % SDS 2 Min bei 70°C erhitzt, sofort im Eisbad abgekühlt, mit 1/10 Vol 60 %iger Sucrose in 1 % Bromphenolblau als Marker versetzt und auf 3,1 %ige Polyacrylamidgele (0,5 x 8 cm) in Elektrophorese-Puffer aufgetragen. Die Konzentrationen des Puffers betrugen 90 mM Tris-Borsäure pH 8.3, 2,5 mM EDTA und 0,2 % SDS. Nach der Elektrophorese (2 Std bei 0,5 m A/Gel, danach 2 Std bei 1,5 m A/Gel) wurden die Gele in 1 % Essigsäure und 30 % Methanol enthaltender 0,1 %igen Toluidinblaulösung 5 Min bei 4°C gefärbt. Der ungebundene Farbstoff wurde im Kältelabor in 20 % Methanol und 1 % Essigsäure aus den Gelen herausgewaschen.

b) 5S RNS Bestimmung

Die 5S RNS-Analyse wurde verändert nach van Diggelen und Bosch (1973) durchgeführt. 12 cm lange Plexiglasröhrchen mit einem inneren Durchmesser von 0,5 cm wurden im Kältelabor zu zwei Drittel mit 10 %igem Polyacrylamidgel in Tris-Essigsäure-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 6, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS) gefüllt. Nach der Polymerisation wurde auf das Gel eine zweite 1,5 cm hohe 5 %ige Gelschicht aufgetragen. Die bei 4°C polymerisierten Gele wurden einem dreistündigen Vorlauf bei 4°C und 2 m A/Gel unterzogen.

Die zu untersuchende RNS wurde in 1 % SDS 2 Min bei 70°C erhitzt und danach sofort im Eisbad abgekühlt. Diese Behandlung verhinderte die Anlagerung von 5S RNS an 23S RNS. Ein Zehntel Volumen einer 11fach konzentrierten Tris-Essigsäure-Pufferlösung wurde hinzugefügt. Nach 30 Min bei Zimmertemperatur wurden 1/10 Volumen 60 %ige Sucrose zugegeben und die Proben schließlich im Kältelabor auf die Gele aufgetragen.

Während der Elektrophorese (15 Std/1,2 m A/Gel; 4°C) zirkulierte der Elektrophorese-Puffer mittels einer Pumpe ständig zwischen Anode und Kathode. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in 12,5 % Trichloressigsäure fixiert und mit einem Gilford Gelscanspektrophometer analysiert.

2.9.2. Protein-Gehalt

Der Proteingehalt der 50S Untereinheiten, core-Partikel und Rekonstitutionspartikel wurde mit der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D) (Kaltschmidt & Wittmann, 1970) bestimmt.

2.9.3. Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten (S)

Die Rekonstitutionszwischenprodukte (RI_{50}) und Rekonstitutionspartikel (R50S) wurden durch Zuckergradientenzentrifugation im Schwingbecherrotor SW 40 auf ihren S-Wert untersucht.

Jeweils 2 A_{260}-Einheiten der Partikel wurden auf den Gradienten aufgetragen (4-20 % Sucrose in Rekonstitutionspuffer) und 5 Std bei 160.000 g zentrifugiert. Durch eine Absaugnadel wurde der Gradient nach der Zentrifugation mittels einer Peristaltikpumpe vom Boden des Röhrchens durch ein Zeiss-Spektralphotometer gedrückt und anschließend fraktioniert (Roth, 1974). Das Photometer war an einen Kipp und Zonen Schreiber angeschlossen, der das Absorptionsprofil aufzeichnete. Die Sucrosekonzentrationen wurden mit einem Zeiss-Refraktometer bestimmt. Die S-Wert-Berechnung erfolgte nach Mc Ewen (1967).

2.10. Funktionelle Untersuchungen

2.10.1. Assoziationsverhalten mit 30S

Um die nichtenzymatische Assoziation von Rekonstitutionspartikeln und nativen 50S Untereinheiten mit 30S zu vergleichen, wurden die Partikel in Gegenwart von 30S bei 10^{-2} M MgAc in einem SW 40 Rotor (10-30 % Sucrose in TMNSH-Puffer) für 18 Std bei 65.000 g zentrifugiert und wie oben beschrieben analysiert.

2.10.2. R17-RNS abhängige Proteinsynthese

Der in-vitro Test mit natürlicher messenger-RNS, nämlich der RNS des Bacteriophagen R17, erfolgte modifiziert nach Funatsu et al (1972).

25 µl eines Präinkubationsgemisches (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM NH_4Cl, 10 mM MgAc, 1 mM Dithiotreitol (DTT), 0,1 mM je Aminosäure mit Ausnahme von Valin, das in einer Konzentration von 0,075 mM vorlag) wurden mit 1 A_{260}-Einheit 30S und 2 A_{260}-Einheiten 50S oder Rekonstitutionspartikel in 15 µl TMNSH Puffer und 35 µl S-150 bzw. RNS-freier S-150 DEAE Enzymfraktion und 1 A_{260}-Einheit t-RNS vermischt und für 30 Min bei 37°C vorinkubiert. Nach der Präinkubation, die dem Verbrauch endogener messenger-RNS und der Aktivierung der Ribosomen diente, wurden (^{14}C)-Valin, nicht gereinigte Initiationsfaktoren, Pyruvatkinase und R17-RNS zugegeben, so daß die Endkonzentrationen in 225 µl Inkubationsgemisch betrugen:

60	mM	Tris-HCl pH 7.5
54	mM	NH_4Cl
8	mM	MgAc
2,25	mM	Dithiotreitol
0,1	mM	je Aminosäure, ausgenommen Valin
0,025	mM	Valin
0,03	µM	(^{14}C)-Valin
0,2	mM	GTP
0,16	mM	ATP
6	mM	Phosphoenolpyruvat
5	mM	PEG 6000.

Nach 30 Min Inkubation bei 37°C wurden je Probe 1 Tropfen 1 % Albumin und 2 ml 5 % Trichloressigsäure zugesetzt. Das hitzestabile Präzipitat (10 Min/90°C) wurde auf einem Glasfilter (Schleicher und Schüll Nr. 6) aufgefangen, mit 3 ml Instagel-Szintillationsflüssigkeit eluiert und in einem Packard Tricarb-Szintillationszähler auf Radioaktivität geprüft.

2.10.3. Poly(U) abhängige Poly(Phe)Synthese

Die Ribosomen und die Rekonstitutionspartikel wurden nach der von Nierhaus et al (1973) veränderten Methode von Nirenberg und Matthaei (1961) im Poly(U) abhängigen Poly(Phe)Synthesesystem getestet.

In 150 µl Inkubationsgemisch waren 40 µg Poly(U), 3 µg Pyruvatkinase, 12 µl S-150 oder 35 µl S150 DEAE Enzymfraktion, 1 A_{260} t-RNS sowie 1 A_{260}-Einheit 30S und 2 A_{260}-Einheiten 50S enthalten; die Endkonzentrationen betrugen:

12,25	mM	Tris-HCl pH 7.6
50	mM	NH_4Cl
12,25	mM	MgAc
0,04	mM	GTP
1,3	mM	ATP
0,001	µM	(^{14}C)-Phenylalanin.

Im Ansatz unter gesättigtem Aminosäureangebot wurde die Phe-Konzentration mit unmarkiertem L-Phenylalanin auf 70 µM erhöht.

Das Gemisch wurde 45 Min bei 30°C oder 37°C inkubiert, und die Radioaktivität des hitzestabilen Trichloressigsäure-Präzipitats wurde gemessen.

2.10.4. Nichtenzymatische Translation

Nach Pestka (1969) wurde die Fähigkeit von 50S und Rekonstitutionspartikeln, ohne Enzyme Poly(Phe) zu synthetisieren, getestet.

In 60 µl Volumen wurden 0,5 A_{260}-Einheiten 30S und 1 A_{260}-Einheit 50S oder Rekonstitutionspartikel mit 20 µg Poly(U), 1 A_{260}-Einheit t-RNS und 0,2 A_{260}-Einheiten (^{3}H)-Phe-$tRNS^{Phe}$ (100.000 cpm) bei Endkonzentrationen von

10 mM Tris-HCl pH 7.0
120 mM NH_4Cl
13 mM MgAc
und 0,1 mM p-Hydroxymercuribenzoesäure

für 5 Std bei 35°C inkubiert. Die Aktivität des hitzestabilen Präzipitats wurde wie oben bestimmt.

2.10.5. Untersuchung der t-RNS Bindung an das Ribosom

2.10.5.1. Enzymatische t-RNS Bindung abhängig von:

a) Elongationsfaktor T

In 100 µl Reaktionsansatz wurden verändert nach Ballesta (1974) 5 µg Poly(U), 1 A_{260}-Einheit (^{14}C)-Phe-t-RNS (40.000 cpm), 1 A_{260}-Einheit 30S und 2 A_{260}-Einheiten 50S oder Rekonstitutionspartikel und 5 µl gereinigter EF-T mit einer Pufferlösung vermischt, so daß die Endkonzentrationen 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NH_4Cl, 5 mM $MgCl_2$ und 1 mM DTT betrugen. Nach Zugabe von 5 µl 0,03 mM GTP wurde 5 Min bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden im Eisbad abgekühlt; die Ribosomen wurden auf einem mit Bindungspuffer (s.o.) angefeuchteten Nitrocellulose-Filter (Sartorius Nr. 113) gesammelt. Der Filter wurde dreimal mit je 3 ml Bindungspuffer gewaschen und anschließend unter einer Infrarotlampe getrocknet. Die Ribosomen wurden mit 3 ml Instagel eluiert und auf Radioaktivität geprüft.

b) Initiationsfaktoren (IF)

Die IF-abhängige t-RNS Bindung wurde verändert nach Zagorska et al (1971) getestet. In 100 µl Volumen wurden zu einer Pufferlösung 5 µg Poly(U), 1,5 A_{260}-Einheiten (^{14}C)-Ac-Phe-t-RNS (60.000 cpm), 1 A_{260}-Einheit 30S, 2 A_{260}-Einheiten 50S oder Rekonstitutionspartikel und 10 µl ungereinigte Initiationsfaktoren gegeben. Bei Endkonzentrationen von

10 mM Tris-HCl pH 7.2
80 mM NH_4Cl
4 mM MgAc
12 mM Mercaptoäthanol
und 0,1 mM GTP

wurde das Gemisch für 20 Min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Ribosomen wie unter a) aufgefangen und die Aktivität bestimmt.

2.10.5.2. Nichtenzymatische t-RNS Bindung

a) Die nichtenzymatische t-RNS Bindung wurde mit dem Filterversuch nach Nirenberg und Leder (1964) und im RNase-Ansatz nach Pestka (1969) getestet. Jede Probe enthielt in 100 µl Volumen 40 µg Poly(U), 1 A_{260}-Einheit (^{14}C)-Phe-t-RNS (30.000 cpm), 0,5 A_{260}-Einheiten 30S und 1 A_{260}-Einheit 50S oder Rekonstitutionspartikel; die Konzentrationen waren

100 mM Tris-HCl pH 7.4
50 mM KCl
12 mM NH_4Cl
24 mM MgAc
2 mM Mercaptoäthanol

Nach einer Inkubation (20 Min/30°C) wurde das Gemisch im Nirenberg und Leder-Versuch mit 2 ml Bindungspuffer verdünnt und die Ribosomen anschließend auf einem Nitrocellulose-Filter gesammelt. Nach zweimaligem Waschen mit je 3 ml Bindungspuffer wurde der Filter getrocknet und die Radioaktivität gemessen. Bei dem RNase-Ansatz nach Pestka wurden nach der 20minütigen Inkubation zu der Probe 12 pg pankreatische Ribonuclease A in 3 µl zugegeben und für weitere 7 Min inkubiert. Mit 2 ml eisgekühlter 5 % Trichloressigsäure wurden die Ribosomen ausgefällt, auf einem Nitrocellulose-Filter aufgefangen und im Szintillationszähler auf Radioaktivität geprüft.

b) Eine weitere Möglichkeit, die t-RNS-Bindung zu untersuchen, war ein Test unter Alkoholbedingungen (Ulbrich & Nierhaus, unveröffentlicht). Hierbei wurden 2,5 A_{260}-Einheiten 50S oder Rekonstitutionspartikel in Rekonstitutionspuffer mit 50 µl einer 1 A_{260}-Einheit (^{3}H)Ac-Leucyl-t-RNS (50.000 cpm) enthaltender Pufferlösung und 50 µl Äthanol vermischt, so daß der Ansatz folgende Endkonzentrationen enthielt:

30	mM	Tris-HCl pH 7.6
135	mM	NH_4Cl
250	mM	KCl
20	mM	MgAc
0,7	mM	Mercaptoäthanol
33	%	Äthanol.

Die t-RNS Bindung unter diesen Bedingungen war weder abhängig von Poly(U) noch von 30S Untereinheiten. Nach 10 Min Inkubation bei 0°C wurden die Ribosomen auf einem mit Bindungspuffer angefeuchteten Nitrocellulose-Filter aufgefangen und die enthaltene Aktivität bestimmt.

2.10.6. Peptidyltransferaseaktivität

2.10.6.1. Puromycin-Reaktion mit enzymatisch gebundener t-RNS

Die Puromycin-Reaktion der Initiationsfaktor-abhängig gebundenen (^{14}C)-Ac-Phe-t-RNS wurde modifiziert nach Zagorska et al (1971) durch Zugabe von Puromycin (Endkonzentration 2,5 mM) zum Bindungstest (s. 2.10.5.1b) untersucht. Nach der Inkubation (20 Min/30°C) wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 0,3 M Na-Acetat, gesättigt mit Mg SO_4, gestoppt, 1,5 ml Äthylacetat zugegeben und nach intensivem Schütteln zur Phasentrennung kurz zentrifugiert. 1 ml der oberen organischen Phase wurde mit 3 ml Instagel vermischt und auf Radioaktivität untersucht.

2.10.6.2. Fragment-Test

Die Rekonstitutionspartikel und 50S Untereinheiten wurden nach Monro (1971),modifiziert von Nierhaus und Montejo (1973),im Fragment-Test auf Peptidyltransferaseaktivität geprüft. 80 µl der Partikel in Rekonstitutionspuffer(2 A_{260}-Einheiten)wurden mit 80 µl einer das t-RNS-Fragment CACCA-(^{3}H)-Leu-Ac (20.000-50.000 cpm) enthaltenden Pufferlösung und 80 µl Äthanol mit Puromycin vermischt; die Endkonzentrationen betrugen:

30 mM Tris-HCl pH 7.4
135 mM NH_4Cl
250 mM KCl
20 mM MgAc
1 mM Puromycin in 33 % Äthanol.

Nach 45 Min Inkubation bei 0°C wurde die Reaktion wie unter 2.10.6.1. abgebrochen und die Aktivität in der organischen Phase gemessen.

2.10.6.3. Test mit Ac-Leucyl-t-RNS

Die Prüfung der Ac-Leu-Puromycin-Reaktion erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie der Fragment-Test, nur wurde anstelle von CACCA-(^{3}H)-Leu-Ac 1 A_{260}-Einheit acetylierte (^{3}H)-Leucyl-t-RNS (50.000 cpm) eingesetzt.

2.10.7. Fragment-Bindung an das Ribosom

Mittels der Gleichgewichtsdialyse wurde die Bindung des Ac-Leucyl-t-RNS-Fragments CACCA-Leu-Ac an 50S und Rekonstitutionspartikel getestet (Ulbrich, unveröffentlicht). Nach einer Hitzeaktivierung der Ribosomen (15 Min/37°C) wurden in die eine Dialysekammer 3 A_{260}Einheiten der Partikel, in die andere CACCA-(^{3}H)-Leu-Ac(20.000 cpm) in jeweils 35 µl Puffer gefüllt, dessen Konzentrationen denen im Fragment-Test entsprechen. Nach 22 Std bei 4°C wurde die Dialyse abgebrochen; aus jeder Kammer wurden zweimal 15 µl entnommen und auf Radioaktivität geprüft. Die durchschnittliche Differenz zwischen den beiden Kammern wurde als Maß für das gebundene Fragment genommen.

2.10.8. Antibiotika-Bindung

Nach Nierhaus & Nierhaus (1973) wurde die Fähigkeit der Partikel untersucht, Chloramphenicol zu binden. Bei der Gleichgewichtsdialyse wurden in eine Kammer 8 A_{260}-Einheiten 50S oder Rekonstitutionspartikel, in die andere 0,5 nM (^{14}C)-Chloramphenicol in je 30 µl Puffer (Endkonzentrationen: 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 280 mM NH_4Cl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM Mercaptoäthanol) eingefüllt. Nach 20 Std bei 4°C wurden aus jeder Kammer jeweils zweimal 10 µl entnommen und deren Aktivität bestimmt. Die Antibiotikabindung an das Ribosom wurde aus der Differenz zwischen den Dialysekammern errechnet.

2.10.9. EF-G abhängige GTPase

Nach Parmeggiani et al (1971) wurden 50S Untereinheiten und rekonstituierte Partikel auf die Fähigkeit getestet, mit 30S und EF-G enzymatisch GTP zu spalten. In 100 µl Inkubationsansatz wurden 45 µl Aquabidest mit 15 µl Gemisch I (0,48 M Tris-HCl pH 7.8, 0,44 M NH_4Cl, 0,065 M $MgCl_2$, 0,01 M Mercaptoäthanol), 15 µl Gemisch II (0,72 mM GTP-Lithium$_{salz}$, 0,005 mM γ-(^{32}P)-GTP (150.000 cpm), 1,5 A_{260}-Einheiten 30S, 3 A_{260}-Einheiten 50S oder rekonstituierte Partikel in 20 µl TMNSH-Puffer und 5 µl Elongationsfaktor G vermischt. Nach 10 Min Inkubation bei 37°C wurden im Eisbad 5 µl 0,05 M KH_2PO_4 und 75 µl 1 M $HClO_4$ zugefügt, kurz ge-

schüttelt und 5 Min bei 3.000 g zentrifugiert. Zu 100 µl des Oberstandes wurden 0,4 ml Essigsäurepropylester und 0,3 ml 0,02 M Na_2 Mo O_4 gegeben und 45 Sek intensiv geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde kurz zentrifugiert (1 Min/5.000 g),und schließlich wurden 150 µl der oberen Phase auf Radioaktivität geprüft.

3. Ergebnisse

3.1. Partielle Rekonstitution

Durch Waschen der 50S Untereinheiten in Lösungen mit steigenden CsCl- oder LiCl-Konzentrationen werden mehr und mehr Proteine abgetrennt. Die erhaltenen core-Partikel sind sowohl im Peptidyltransferase-Test als auch in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe)-Synthese nicht aktiv. Inkubiert man die cores zusammen mit den komplementären split-Proteinen unter Rekonstitutionsbedingungen, so gewinnen sie ihre Aktivitäten weitgehend zurück (Staehelin, Maglott & Monro, 1969; Nierhaus & Montejo, 1973).

Um cores zu präparieren, die nur wenige Proteine enthielten oder u.U. nur aus RNS bestanden, wurden 50S-Untereinheiten in sehr hoch konzentrierten Lithiumchlorid-Puffern (4-8 M LiCl) inkubiert. Tabelle I zeigt die Proteinzusammensetzung der core-Partikel:

core Partikel	50S-Proteine L2	L3	L4	L13	L15	L17	L20	L21	L22	L23	L29
4,0 c	±	+	+	+	±	+	(+)	+	+	(+)	(+)
5,0 c	-	+	(+)	+	-	+	(+)	-	(+)	-	-
6,0 c	-	(+)	-	+	-	(+)	-	-	-	-	-
8,0 c	-	±	-	±	-	±	-	-	-	-	-

Der Proteingehalt wurde nach der 2D-Gelelektrophorese abgeschätzt:
+ normale Proteinmenge
(+) verminderte Proteinmenge
± Protein in Spuren sichtbar
- Protein nicht vorhanden.

Alle cores, die bei LiCl-Konzentrationen von 4 M und kleiner vorbereitet worden waren, konnten bei Inkubation mit den split-Proteinen zu voll aktiven R50S rekonstituiert werden. Sogar das 5,0 c core zeigte rekonstituiert signifikante Aktivitäten im Poly(Phe)-Synthesesystem wie im Fragment-Test, wohingegen das 6,0 c core nicht zu einem aktiven R50S wiederherzustellen war. Der Grund dafür sollte am core-Partikel zu suchen sein, denn die split-Proteine sp5.0 und sp6.0 waren aktiv bei der Rekonstitution mit dem 4,0 c core (s. Tabelle II, A).

Tabelle II: Rekonstitution von LiCl-core-Partikeln

	Rekonstitution	Peptidyltransferase Aktivität %	Poly(Phe)-Synthese Aktivität %
A	4,0c +5S RNS	0,1	0,1
	sp4.0 +5S RNS	0	0
	4,0c +sp4.0 +5S RNS	70	85
	5,0c +sp5.0 +5S RNS	23	29
	6,0c +sp6.0 +5S RNS	0	0,3
	4,0c +sp5.0 +5S RNS	77	76
	4,0c +sp6.0 +5S RNS	66	75
	Kontrollen	50S 100 (6262 cpm)	30S + 50S 100 (44361 cpm)
B	4,0c +sp4.0 +5S RNS	37	88
	4,0c +sp4.0	23	75
	4,0c(Sepharose)+sp4.0	2	1,7
	4,0c(Sepharose)+sp4.0 +5S RNS	27	78
	Kontrollen	50S 100 (4321 cpm)	30S+50S 100 (17337cpm)

Die Rekonstitution zeigte eine fast völlige Unabhängigkeit von der Zugabe von 5S RNS, obwohl beschrieben worden ist (Marcot-Queiroz & Monier, 1967; Yu & Wittmann, 1973), daß 5S RNS bei höheren LiCl-Konzentrationen als 1,5 - 2 M zusammen mit den Proteinen von 50S abgewaschen wird und die split-Proteine durch Essigsäure-

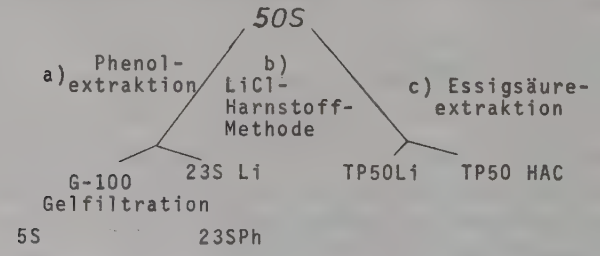
extraktion von RNS befreit worden waren. Dieser Befund war dadurch zu erklären, daß die freie, abgetrennte 5S RNS bei einer LiCl-Konzentration von 4 M präzipitierte, durch die Ultrazentrifugation bei der core-Gewinnung sedimentiert und zusammen mit den cores resuspendiert wurde.

Die ungebundene 5S RNS wurde durch Gelfiltration (Sepharose 4 B; 2 cm mal 50 cm) vom core-Partikel getrennt, und es zeigte sich jetzt vollständige Abhängigkeit des 4,0 c cores (Sepharose) in der Rekonstitution mit sp-Proteinen von 5S RNS (siehe Tabelle II, B).

3.2. Einstufige Totalrekonstitution

3.2.1. Allgemeines

Durch die LiCl-Technik war es nicht gelungen, alle ribosomalen Proteine von der 23S RNS zu lösen. Um dies zu erreichen, wurden Proteine und RNS auf verschiedene Arten vorbereitet:



a) 23S RNS und 5S RNS wurden durch Phenolextraktion gewonnen und anschließende Säulenchromatographie voneinander getrennt (23S Ph; 5S).

b) Proteine und RNS wurden nach der LiCl-Harnstoff-Methode (Nomura & Erdmann, 1970) präpariert (23S Li; TP 50 Li).

c) Proteine wurden durch Essigsäureextraktion isoliert (Hardy et al, 1969) (TP 50 HAC)

(für eine genauere Beschreibung siehe Methoden).

Alle möglichen Kombinationen von RNS- und Proteinfraktionen wurden unter den Bedingungen der partiellen Rekonstitution getestet (s. Tabelle III).

Tabelle III: Rekonstitution von verschiedenen RNS- und Proteinpräparationen

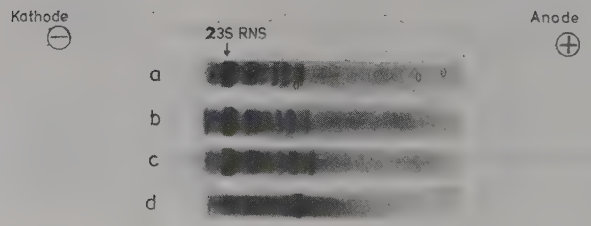
Rekonstitution	Peptidyltransferase %	Poly(Phe)-Synthese %
23S Li + TP 50 Li + 5S	1,4	29
23S Li + TP 50 Li	1,7	28
23S Li + TP 50 HAC+ 5S	1,9	26
23S Li + TP 50 HAC	1,7	27
23S Ph + TP 50 Li + 5S	3,6	26
23S Ph + TP 50 Li	3,1	17
23S Ph + TP 50 HAC+ 5S	5,2	32
23S Ph + TP 50 HAC	1,5	0,3
Kontrollen	50S 100 (3323 cpm)	30S + 50S 100 (51634 cpm)

Bei Gegenwart von 5S RNS ergaben alle Kombinationen deutliche Aktivität im Poly(Phe)-Synthesesystem. Nur wenn 23S Ph mit TP 50 HAC rekonstituiert wurde, zeigte sich eine direkte Abhängigkeit von 5S RNS-Zugabe, was veranschaulicht, daß sowohl die RNS als auch die Proteinfraktion, die nach der LiCl-Harnstoff-Methode vorbereitet waren (23S Li; TP 50 Li) 5S RNS enthielten.

Beide 23S RNS-Präparationen sind in der 2D-Gelelektrophorese auf Proteingehalt untersucht worden. In der 23S Li-Fraktion waren die Proteine L3, L13, L17, L22 und Spuren weiterer L-Proteine zu finden, wohingegen 23S Ph vollständig proteinfrei war. Bei der Rekonstitution mit 23S Li hielt es sich also - streng genommen - nicht um eine totale Rekonstitution, denn einige Proteine blieben stets an der RNS gebunden. Aus diesen Gründen wurde bei den folgenden Versuchen vornehmlich mit durch Phenolextraktion gewonnenen 23S und 5S RNS und mit essigsäureextrahierten Proteinen gearbeitet.

Die rekonstituierten Partikel konnten Poly(Phe) synthetisieren, waren aber im Fragment-Test nicht aktiv. Die RNS-Gelelektrophorese zeigte, daß die Partikel nach der Inkubation zerstörte 23S RNS enthielten, wohingegen nicht isolierte RNS von 50S und nicht oder ohne Proteine inkubierte 23S RNS kaum degradiert waren (s. Abb. 4).

Abb. 4: Polyacrylamid-Gelelektrophorese von ribosomaler RNS



Nach RNS-Gelelektrophorese (Ceri & Maeba, 1973) erhaltene RNS-Banden von nicht isolierter RNS von 50S Untereinheiten (a), nicht (b) und ohne Proteine inkubierter (c) RNS, von RNS der rekonstituierten Partikel (d).

Es bestand offensichtlich ein Zusammenhang zwischen Inaktivität der rekonstituierten Partikel und Zerstörung ihrer 23S RNS.

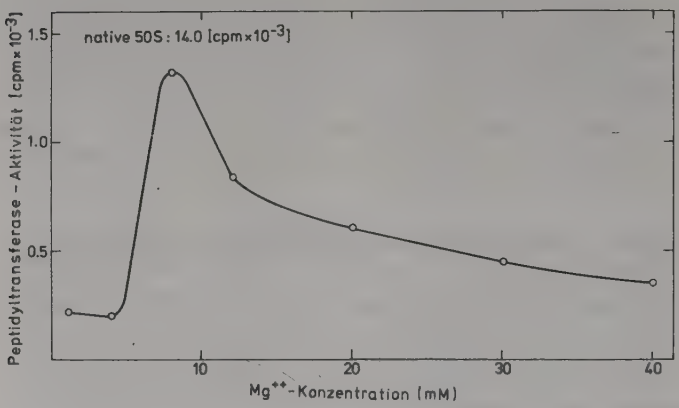
3.2.2. Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen

Um bessere Aktivitätsausbeuten zu erzielen, wurden die Ionen- und Inkubationsbedingungen für die Totalrekonstitution zunächst unter konstanten Bedingungen während der Inkubation (einstufige Totalrekonstitution) optimiert und wegen der oben beschriebenen Korrelation zwischen intakter RNS und Aktivität die Zugabe von als Hemmer von Ribonucleasen bekannten Reagenzien studiert.

3.2.2.1. Mg^{++}-Konzentration

Bei Veränderung der Mg Ac-Konzentration während der Rekonstitution ergab sich ein scharfes Maximum der Peptidyltransferaseaktivität bei 8mMMg^{++} (s. Abb. 5).

Abb. 5: Peptidyltransferaseaktivität der bei verschiedenen Mg^{++}-Konzentrationen einstufig rekonstituierten Partikel



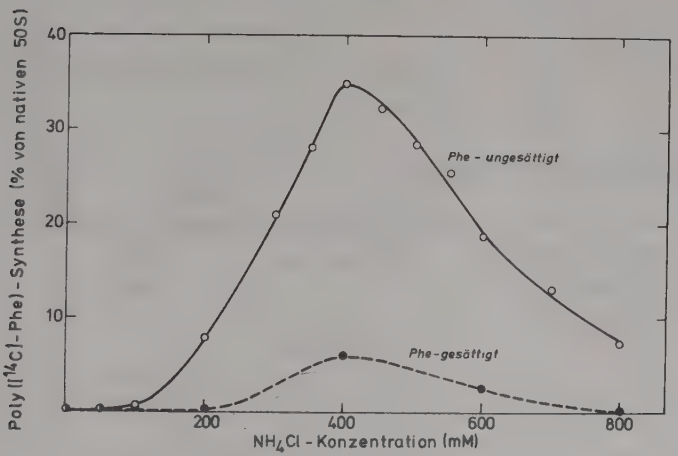
Nach der Inkubation bei den angegebenen Mg^{++}-Konzentrationen wurden die Mg Ac-Konzentrationen bei $0^{o}C$ auf 40 mM eingestellt und anschließend der Fragment-Test durchgeführt.

Dennoch betrug die höchste Aktivität der R50S weniger als 10 % von nativen 50S-Untereinheiten.

3.2.2.2. NH_4Cl-Konzentration und andere monovalente Salze

Abbildung 6 zeigt die Aktivitäten der rekonstituierten Partikel im Poly(Phe)-Synthesesystem unter gesättigten und nicht-gesättigten Phenylalanin-Konzentrationen in Abhängigkeit von verschiedenen Ammoniumchloridkonzentrationen während der Rekonstitution:

Abb. 6: Poly(U) abhängige Poly(Phe)-Synthese von bei verschiedenen NH_4Cl-Konzentrationen rekonstituierten Partikeln



Vor dem Funktionstest wurde die NH_4Cl-Konzentration auf 800 mM eingestellt. Die Aktivität von nativen 50S betrug 64.200 cpm beim Test unter ungesättigtem Aminosäureangebot und 15.470 cpm bei gesättigten Phe-Konzentrationen.

Das Optimum bei 400 mM NH_4Cl war identisch mit dem der partiellen Rekonstitution (Staehelin, Maglott & Monro, 1969). Um die NH_4Cl-Abhängigkeit zu beschreiben, wurden im Poly(U)-Test ungesättigte Phe-Konzentrationen verwandt, da bei gesättigtem Aminosäureangebot die Aktivitäten der Partikel zu gering waren, um eine eindeutige Aussage über ein Aktivitätsoptimum zu erlauben. Wenn nicht anders angegeben, sind alle Poly(U)-Tests nach der einstufigen Totalrekonstitution mit ungesättigten Phe-Konzentrationen durchgeführt worden.

Im folgenden Experiment wurde Ammoniumchlorid während der Rekonstitution durch zwei andere einwertige Salze ersetzt und die Aktivitäten im Poly(U)-Ansatz geprüft (Tabelle IV):

Tabelle IV: NH_4Cl im Vergleich zu anderen monovalenten Salzen

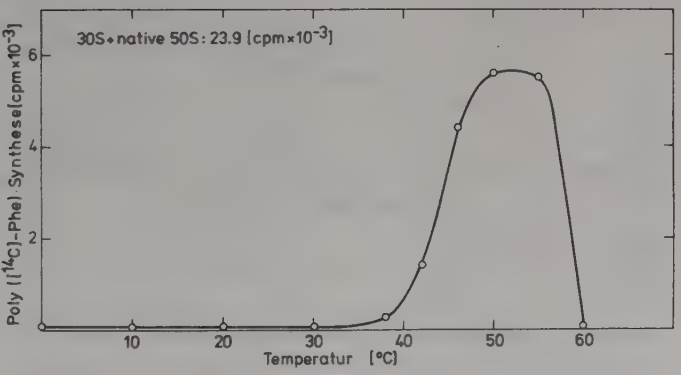
Rekonstitutionsbedingung		Poly(Phe)-Synthese cpm
400 mM	NH_4Cl	16514
400 mM	KCl	4352
400 mM	LiCl	506
	Kontrolle 50S	64312

Weder Kaliumchlorid noch Lithiumchlorid konnten NH_4Cl im Rekonstitutionsansatz ohne Verminderung der Aktivität ersetzen.

3.2.2.3. Inkubationstemperatur

Wie aus Abbildung 7 zu ersehen ist, beträgt die beste Temperatur für die einstufige Totalrekonstitution ungefähr 50°C:

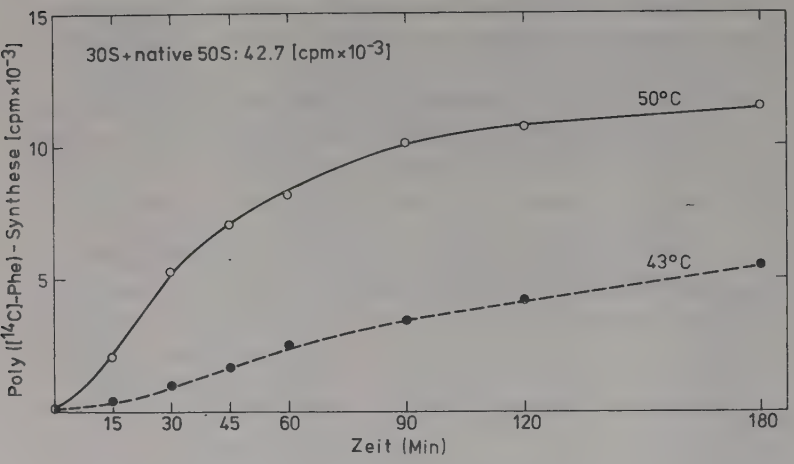
Abb. 7: Poly(Phe)-Synthese der R50S nach Rekonstitution bei verschiedenen Temperaturen



3.2.2.4. Inkubationsdauer

Kinetiken ergaben eine optimale Inkubationsdauer von wenigstens 90 Min bei 50°C Inkubationstemperatur, wohingegen bei 43°C vergleichbare Aktivität sogar nach 180minütiger Inkubation noch nicht erreicht wurde (Abb. 8).

Abb. 8: Rekonstitutionskinetiken bei 43°C und 50°C



3.2.2.5. Zusatz von energiereichen Verbindungen und S150 Oberstandsenzymen

Bei den folgenden Untersuchungen wurde getestet, ob die Zugabe von energiereichen Verbindungen wie ATP, GTP und Phosphoenolpyruvat (PEP) und/oder der Zusatz von S150 Enzymfraktion während der Rekonstitution die Aktivität der R50S stimulieren könnten. Die Versuche

wurden sowohl bei 50°C als auch bei 43°C durchgeführt, da einige der S150 Enzyme während der 50°C-Inkubation ausfielen.

Tabelle V: Zugabe von energiereichen Verbindungen und S150 Enzymfraktion

Rekonstitutions-bedingung	Zusätze	Poly(Phe)Synthese cpm
90Min/50°C		10002
90Min/50°C	ATP, GTP, PEP	7747
90Min/50°C	S150 Enzyme	8876
90Min/50°C	ATP, GTP, PEP, S150 Enzyme	5522
120Min/43°C		2649
120Min/43°C	ATP, GTP, PEP	3467
120Min/43°C	S150 Enzyme	2003
120Min/43°C	ATP, GTP, PEP, S150 Enzyme	3222
	Kontrolle 50S	61019

Bei Zugabe der energiereichen Verbindungen betrugen die Konzentrationen für ATP 1,3 mM, GTP 0,6 mM und Phosphoenolpyruvat 7,7mM, außerdem wurden - wenn beschrieben - 12 μl S150-Enzymfraktion zugefügt.

Aus der Tabelle kann geschlossen werden, daß keiner der verschiedenen Zusätze die Aktivität der Partikel merklich erhöhen konnte.

3.2.2.6. Einfluß der 30S Untereinheit

Kreider und Brownstein (1971) hatten diskutiert, daß die 30S Untereinheit die Bildung von 50S, zumindest in vivo, beeinflussen könnte. Bei der in vitro Rekonstitution zeigte die Gegenwart von 30S oder TP 30 jedoch eine Reduzierung der Aktivität (Tabelle VI):

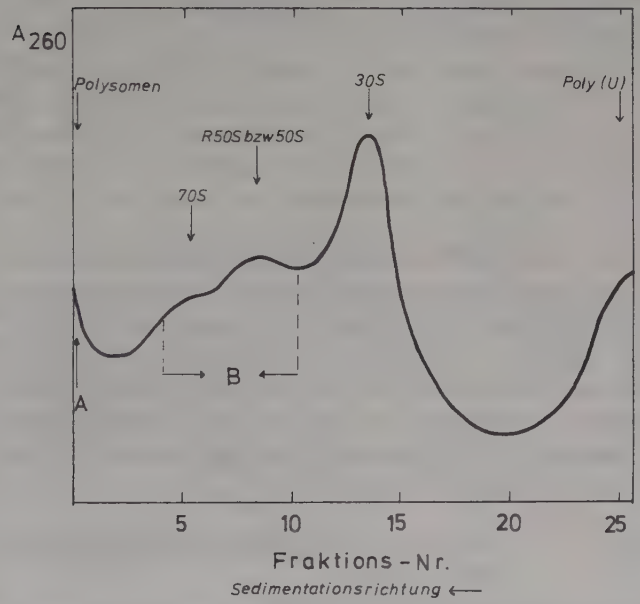
Tabelle VI: Zugabe von 30S und TP 30 während der Rekonstitution

Rekonstitutionsbedingung	Zusätze	Poly(Phe)-Synthese cpm
120Min/43°C		19345 (550)
120Min/43°C	1,5 A_{260}-Einheiten 30S	11211 (264)
120Min/43°C	2,5 eU TP 30	7486 (526)
	Kontrolle 50S	73137 (25393)

Die Poly(Phe)-Synthese wurde unter ungesättigten und gesättigten (Werte in Klammern) (Phe)-Konzentrationen gemessen.

Außerdem wurde untersucht, ob die Aktivität der R50S durch die Assoziation mit 30S in Gegenwart von messenger-RNS wie Poly(U) nach der Rekonstitution verbessert werden könnte: 30 A_{260}-Einheiten R50S oder native 50S wurden mit 30 A_{260}-Einheiten 30S und 15 A_{260}-Einheiten Poly(U) 5 Min bei 37°C unter TMNSH-Bedingungen inkubiert und auf einen 4-20 %igen Zuckergradienten aufgetragen. Nach achtstündiger Zentrifugation bei 80.000 g in einem SW27-Rotor wurde der Gradient fraktioniert. Die Polysomen enthaltenden Sedimente wurden in TMNSH-Puffer resuspendiert (A); die Fraktionen mit rekonstituierten Partikeln oder nativen 50S wurden gesammelt, die Teilchen durch Ultrazentrifugation isoliert und ebenfalls in TMNSH-Puffer aufgenommen (B) (Abb. 9).

Abb. 9: Sedimentationsprofil von 30S, R50S bzw. 50S, 70S und Polysomen nach Zuckergradientenzentrifugation



Anschließend wurden die Partikel auf Poly(Phe)-Syntheseaktivität getestet; eine Stimulierung der Aktivitäten durch diese Behandlung blieb aus (Tabelle VII).

Tabelle VII: Aktivitäten der Partikel nach Assoziation mit 30S

Art der Partikel	Behandlung der Partikel	Poly(Phe)-Synthese cpm
R50S	unbehandelt	10494
R50S	A	10456
R50S	B	10063
native 50S	unbehandelt	64075
native 50S	A	62820
native 50S	B	61262

Unbehandelt: direkt getestet (z.B. R50S nach Rekonstitution); A, B: Partikel wurden nach Assoziation mit 30S und Poly(U) in Sucrosegradienten analysiert und fraktioniert, wie in Abb. 9 gezeigt.

3.2.2.7. Zusatz von Polyaminen

Hosokawa et al (1973) beschrieben eine positive Wirkung von Polyaminen auf die Bildung von 50S Untereinheiten von E.coli Ribosomen. Die Zugabe der Polyamine zum Rekonstitutionsansatz ergab keine Aktivitätssteigerung (Tabelle VIII). Im Gegenteil wurde die Aktivität der R50S durch Spermin und Spermidin beträchtlich gehemmt, Putrescin zeigte bei den getesteten Konzentrationen keinen Effekt.

Tabelle VIII: Zugabe von Polyaminen während der Rekonstitution

Rekonstitutionsbedingung	Zusätze	Poly(Phe)-Synthese cpm	Peptidyltransferaseaktivität cpm
90 Min/50°C		28634	134
90 Min/50°C	0,5 mM Spermin	25629	106
90 Min/50°C	2 mM Spermin	2784	65
90 Min/50°C	4 mM Spermidin	25092	176
90 Min/50°C	16 mM Spermidin	6292	86
90 Min/50°C	0,5 mM Putrescin	29781	131
90 Min/50°C	3 mM Putrescin	28345	141
	Kontrollen		
	30S + 50S	75824	50S 3204

3.2.2.8. Wirkung von Ribonucleasehemmern

Der offensichtliche Zusammenhang von geringer Aktivität der rekonstituierten Partikel und der Degradierung ihrer 23S RNS (s.o.) führte zu folgenden Experimenten:

Während der Rekonstitution wurden ansteigende Mengen von Reagenzien zugesetzt, die als Hemmer von Ribonucleasen beschrieben worden waren (Ceri & Maeba, 1973). Diese Substanzen verminderten jedoch auch die Aktivität der Partikel in starkem Maße (Tabelle IX).

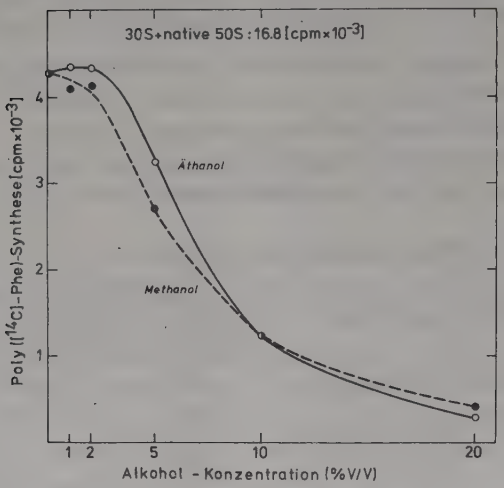
Tabelle IX: Zugabe von Ribonucleasehemmern

Rekonstitutionsbedingungen	Zusätze	Poly(Phe)-Synthese cpm	Peptidyltransferaseaktivität	cpm
90 Min/50°C		13660		358
90 Min/50°C	0,5 mM $HgCl_2$	116		23
90 Min/50°C	0,5 mM $ZnCl_2$	10936		136
90 Min/50°C	2 mM $ZnCl_2$	64		45
90 Min/50°C	0,1 mM SDS	7096		170
90 Min/50°C	0,4 mM SDS	1788		63
		Kontrollen		
	30S + 50S	50988	50S	6605

Quecksilberchlorid ($HgCl_2$) hemmte die Aktivität schon bei einer Konzentration von 0,5 mM vollständig. Zinkchlorid ($ZnCl_2$) und Natriumdodecylsulfat (SDS) erwiesen sich ebenfalls bei geringen Konzentrationen (0,5-2 mM bzw. 0,4 mM) als starke Aktivitätshemmer.

Methanol (MeOH) und Äthanol (EtOH) zeigten in ihrer Hemmwirkung ein ähnliches Verhalten (Abb. 10):

Abb. 10: Einfluß von Alkoholzugabe während der einstufigen Totalrekonstitution



3.3. Zweistufige Totalrekonstitution

Sämtliche Versuche mit der einstufigen Totalrekonstitution führten zu Partikel, die sehr geringe Aktivität (< 10 % von nativen 50S Untereinheiten) im Fragment-Test und im Poly(U)-Ansatz bei gesättigten (Phe)-Konzentrationen hatten, jedoch signifikante Aktivitäten bei der Poly(Phe)-Synthese bei ungesättigtem Aminosäureangebot zeigten.

3.3.1. Stufenweise Zugabe von Proteinen

Da das 4,0 c core bei diesen Rekonstitutionsbedingungen zu voll aktiven 50S wiederhergestellt werden konnte (Tabelle II), wurde zunächst eine stufenweise Zugabe von Proteinen versucht, bei der durch Inkubation von 23S RNS, 5S RNS und essigsäureextrahierten 4,0 c-Proteinen (4,0 c HAC) das 4,0 c core zurückgewonnen und unter konstanten Bedingungen in einer zweiten Stufe die komplementären Split-Proteine (sp 4.0) zugefügt wurden, um zu 50S Ribosomen zu gelangen:

$$\text{23S RNS} \xrightarrow[\text{Proteine}]{\text{5S RNS}} \text{4,0 c core} \xrightarrow[\text{Proteine}]{} \text{50S.}$$

Die Ergebnisse in Tabelle X veranschaulichen, daß wiederum keine Aktivitätsverbesserung erzielt werden konnte.

Tabelle X: Stufenweise Zugabe der ribosomalen Proteine

Rekonstitution	Poly(Phe)-Synthese %	Peptidyltransferaseaktivität %
23S + 4,0 c HAC + sp4.0+5S a)	19	1,6
23S + 4,0 c HAC + 5S ⟶ + sp4.0 b)	17	1,4
	Kontrolle 100 50S (37725cpm)	100 (4610 cpm)

a) die vier Komponenten wurden zusammen für 90 Min bei 50°C inkubiert;

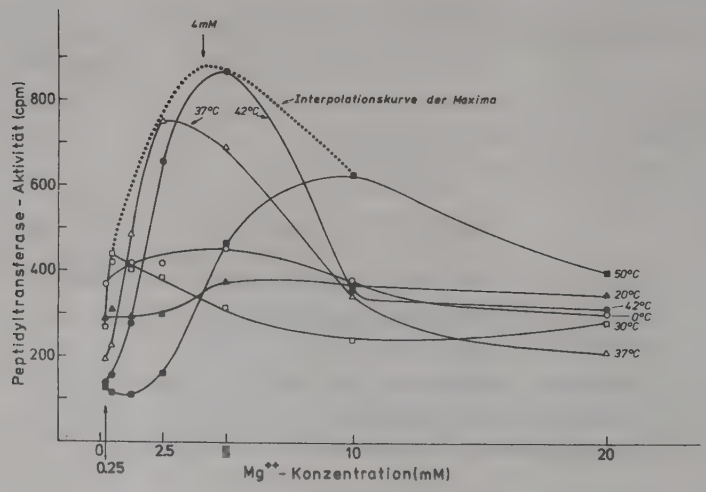
b) 23S, 4,0 c HAC und 5S RNS wurden 30 Min bei 50°C inkubiert, anschließend wurde sp 4,0 zugesetzt und die Inkubation für weitere 60 Min fortgesetzt.

Nach zweistufiger Rekonstitution wurden die Partikel, wenn nicht anders angegeben, im Poly(U)-Ansatz bei gesättigten Phe-Konzentrationen getestet.

3.3.2. Stufenweise Veränderung der Ionen- und Inkubationsbedingungen

In den folgenden Experimenten wurde die Möglichkeit untersucht, ob ein erster Rekonstitutionsschritt andere optimale Ionen- und Inkubationsbedingungen benötigt als eine spätere Rekonstitutionsstufe, die der partiellen Rekonstitution entsprechen könnte. 23S RNS, 5S RNS und TP 50 wurden bei verschiedenen Mg^{++}-Konzentrationen und steigenden Temperaturen für 30 Min inkubiert, anschließend wurden die Ionenbedingungen denen der partiellen Rekonstitution angeglichen und die Inkubation weitere 60 Min bei 50°C fortgesetzt. In diesem Versuch zeigten sich deutliche Aktivitäten auch im Fragment-Test (s. Abb. 11), entsprechende Kurven wurden durch Messungen der Poly(Phe)-Synthese erhalten.

Abb. 11: Peptidyltransferaseaktivitäten der Partikel nach zweistufiger Totalrekonstitution



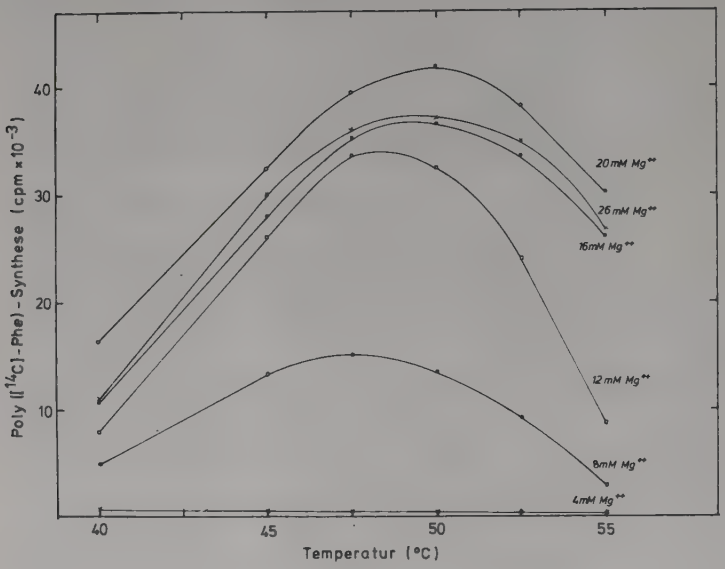
Im ersten Schritt wurde bei verschiedenen MgAc-Konzentrationen (0,25-20 mM) und Temperaturen ($0^{o}C$-$50^{o}C$) inkubiert, schließlich wurde die Mg Ac-Konzentration auf 20 mM eingestellt, und die zweite Inkubation bei $50^{o}C$ schloß sich an. Die Aktivitäten im Fragment-Test sind gegen die Mg^{++}-Konzentrationen im ersten Schritt bei verschiedenen Temperaturen aufgetragen. Die Maxima der verschiedenen Kurven wurden zu einer Interpolationskurve verbunden.

Die Interpolation der Aktivitätsmaxima bei den verschiedenen Temperaturen führte zu einem Mg^{++}-Optimum von 4 mM bei Temperaturen um $40^{o}C$ für die erste Rekonstitutionsstufe.

Die Optimierung der NH_4Cl-Konzentration während des ersten Schrittes zeigte die höchste Aktivität bei 400 mM, was der Bedingung bei der einstufigen Rekonstitution entsprach (s. Abb. 6).

Auf ähnliche Weise wurden die besten Konditionen für die zweite Rekonstitutionsstufe ermittelt. Bei konstanten Bedingungen während der ersten Stufe wurde die Mg Ac-Konzentration bei verschiedenen Inkubationstemperaturen differiert. Bei 20 mM Mg Ac und $50^{o}C$ im zweiten Schritt wurde die höchste Aktivitätsausbeute erzielt (Abb. 12).

Abb. 12: Poly(Phe)-Syntheseaktivität der Partikel nach zweistufiger Rekonstitution



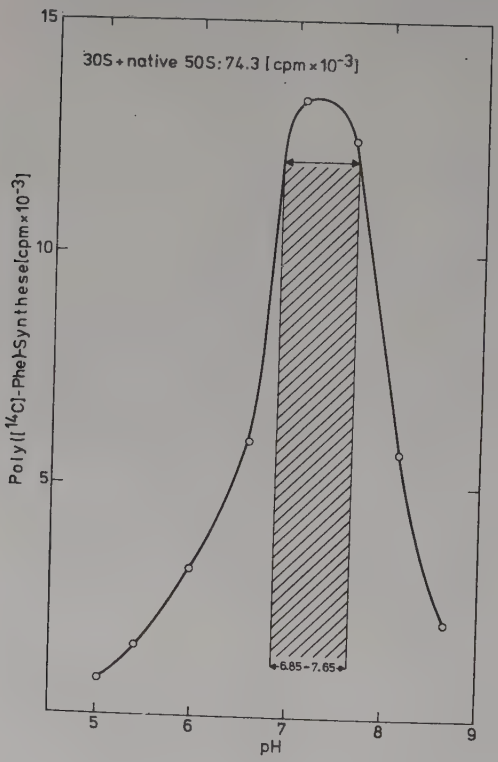
Nach 30minütiger Inkubation bei 40°C und 4 mM Mg Ac im ersten Schritt wurde in der zweiten Stufe bei verschiedenen Mg Ac-Konzentrationen (4-26 mM) und Temperaturen (40°-55°C) inkubiert. Die Aktivitäten im Poly(U)-Ansatz sind gegen die Temperaturen im zweiten Schritt bei verschiedenen Mg^{++}-Konzentrationen aufgetragen.

Die optimale Ammoniumchlorid-Konzentration in der zweiten Stufe lag wiederum bei 400 mM. Diese Bedingungen stimmten, wie vermutet, mit denen der partiellen Rekonstitution überein.

3.3.3. Optimierung des pH-Wertes

Die beste H^+-Ionenkonzentration (pH-Wert) für die Rekonstitution wurde durch Inkubation von RNS und Proteinen in Natriumbarbitalpuffer (pH 5-9) bei sonst konstanten Ionenbedingungen bestimmt. Abbildung 13 zeigt, daß im Bereich von pH 6,9 - pH 7,65 die Rekonstitution zu aktiven Partikeln möglich ist.

Abb. 13: Abhängigkeit der Rekonstitution vom pH-Wert

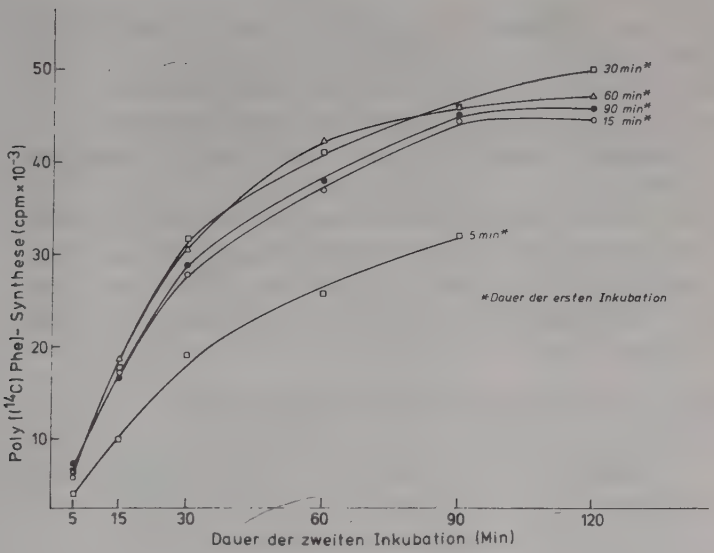


Die zweistufige Inkubation wurde in einem 30 mM Barbital-Natriumacetat-Salzsäure-Puffer (Michaelis, 1931) bei verschiedenem pH durchgeführt. Die Partikel wurden durch PEG 6000 Fällung isoliert und auf Poly(Phe)-Synthese getestet.

3.3.4. Bestimmung der Inkubationszeiten

Die Dauer der Inkubationen wurde durch Kinetiken der zweiten Rekonstitutionsstufe bei verschieden langer Inkubation im ersten Schritt bestimmt (Abb. 14).

Abb. 14: Bestimmung der Inkubationszeiten im ersten und zweiten Rekonstitutionsschritt



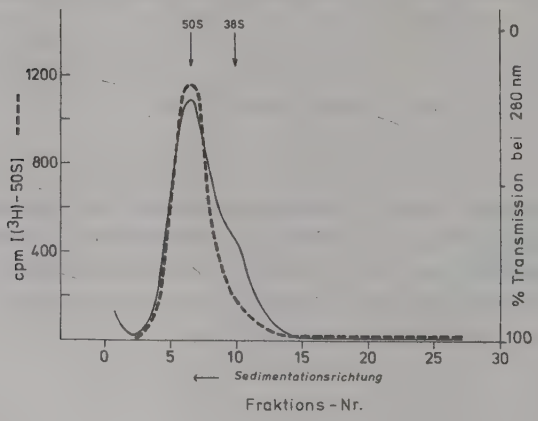
Bei verschieden langer Inkubation während der ersten Stufe wurden Kinetiken bezüglich der zweiten Inkubation angestellt und die Poly(Phe)-Synthese der R50S gemessen. Bei Messung der Peptidyltransferaseaktivitäten wurden ähnliche Kurven erhalten.

Für die erste Inkubation erwiesen sich 15 Min als ausreichend, wohingegen im zweiten Schritt 90 Min Inkubation erforderlich waren.

3.3.5. Vergleich der R50S mit nativen Untereinheiten

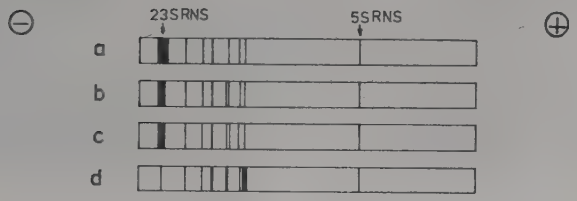
In einem größeren Ansatz wurden unter den bestimmten Bedingungen (I: 20 Min/40°C/4 mM Mg Ac; II: 90 Min/ 50°C/20 mM Mg Ac) Rekonstitutionspartikel hergestellt und im Vergleich zu nativen 50S Untereinheiten verschiedenen strukturellen und funktionellen Tests unterworfen:
Die Partikel sedimentierten wie die Untereinheiten mit einem Sedimentationskoeffizienten von 50S (Abb. 15), ihre 23S RNS war jetzt kaum degradiert (Abb. 16), und ihr Proteingehalt entsprach dem der unbehandelten 50S Ribosomen (Abb. 17).

Abb. 15: Sedimentationsverhalten der R50S



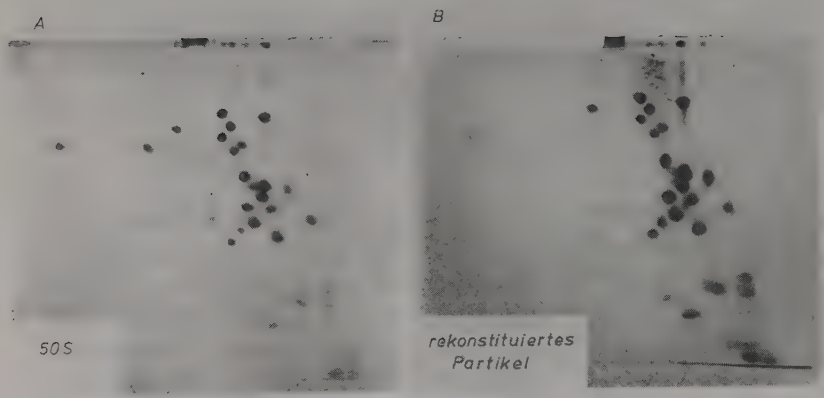
A_{260}-Profil von 3 A_{260} -Einheiten der Rekonstitutionspartikel und (^{3}H)-cpm von 1 A_{260} (^{3}H)-markierten 50S Untereinheiten nach Zentrifugation in einem SW 40 Rotor (5 Std/160.000 g).

Abb. 16: Gelelektrophorese von rekonstituierten Partikeln



RNS-Banden von 50S Untereinheiten (a) und Partikeln aus 23S, 5S und TP 50 ohne Inkubation (b), nach zweistufiger (c) und einstufiger Inkubation (d) (siehe Methoden).

Abb. 17: Proteingehalt der R50S



Proteinmuster von nativen 50S und zweistufig rekonstituierten Partikeln nach 2D-Gelelektrophorese.

Tabelle XI zeigt die Aktivitäten der zweistufig rekonstituierten Partikel in der R17-RNS abhängigen Proteinsynthese, in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe)-Synthese bei ungesättigter (Phe)-Konzentration, im Fragment-Test und bei der Chloramphenicolbindung.

Tabelle XI: Aktivitäten der R50S in verschiedenen Funktionstests

	Chloramphenicolbindung (pmol/nmol-Partikel)	Peptidyltransferase (Fragment-Test (%))	Poly(U)-abhängige (^{14}C)Poly-(Phe)-Synthese (%)	R17-System (%)
23S+5S RNS	0	0	0	-
TP 50	26	0	0	-
23S+5S RNS+TP50	183	48	109	55
Native 50S	456	100 (3377 cpm)	100 (61757cpm)	100 (28660 cpm)

Die durch zweistufige Inkubation rekonstituierten Partikel zeigten in den für die 50S Untereinheit spezifischen Funktionstest deutliche Aktivitäten: ~50 % im System mit natürlicher messenger-RNS, im Fragment-Test und bei der Antibiotikabindung, ~100 % im Poly-U-Ansatz bei ungesättigtem (Phe)-Angebot.

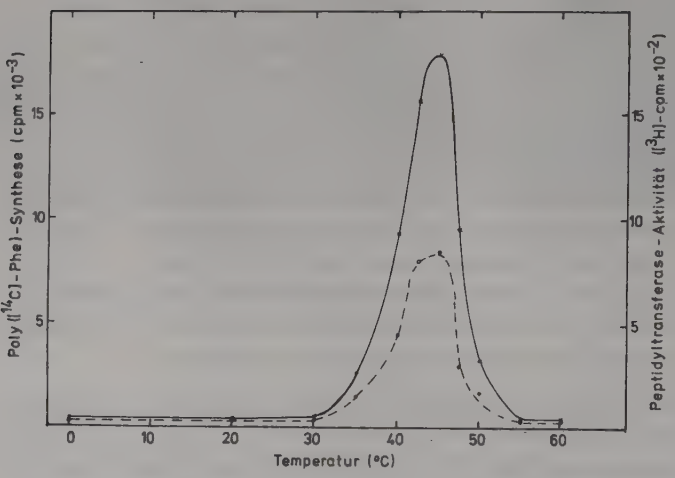
Sämtliche untersuchten Eigenschaften der ribosomalen 50S Untereinheiten ließen sich also auch bei den rekonstituierten Partikeln nachweisen, was eine erfolgreiche Totalrekonstitution bewies.

3.3.6. Verfeinerung der Rekonstitutionstechnik

In den folgenden Experimenten wurde versucht, die Rekonstitutionstechnik zu vereinfachen und zu verfeinern.

Um eine Paramenteränderung während der Rekonstitution zu umgehen, wurde die zweistufige Inkubation (4 mM Mg Ac ⟶ 20 mM Mg Ac) bei steigenden, jedoch im ersten und im zweiten Schritt gleichen Temperaturen durchgeführt.

Abb. 18: Zweistufige Rekonstitution (4 mM ⟶ 20 mM Mg Ac) bei steigenden Temperaturen



Nach 20 Min Inkubation bei 4 mM Mg Ac und den angegebenen Temperaturen ($0^{o}C$-$60^{o}C$) wurde die Mg^{++}-Konzentration auf 20 mM eingestellt und die Inkubation bei nicht veränderter Temperatur weitere 90 Min fortgesetzt.

Die Poly(Phe)-Synthese- und Peptidyltransferaseaktivitäten der Kontrollrekonstitution (20 Min/$40^{o}C$/4 mM Mg^{++} ⟶ 90 Min/$50^{o}C$/20 mM Mg^{++}) betrugen 18.011 cpm bzw. 875 cpm.

Als optimale Inkubationstemperatur wurde unter diesen Bedingungen 44°C ermittelt (Abb. 18). Die erhaltenen Partikel zeigten ungefähr die gleichen Aktivitäten wie die bei der Kontrollrekonstitution (40°C im ersten und 50°C im zweiten Schritt).

Verschiedene Rekonstitutionstemperaturen während der zwei Inkubationsschritte (I; II) wurden verglichen:

Tabelle XII:

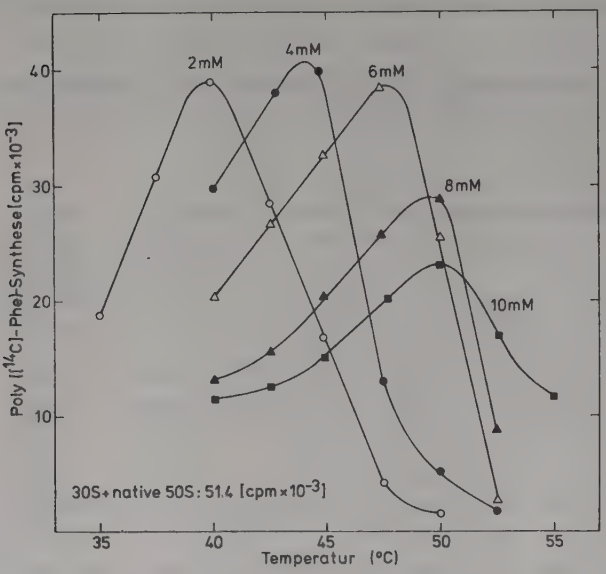
RNS	Proteine	I Temperatur	II	Poly(Phe) Synthese	Peptidyltransferase
				cpm	
23S + 5S + TP50		40°C	50°C	20830	3048
23S + 5S + TP50		44°C	44°C	17930	2947
23S + 5S + TP50		44°C	50°C	27350	3778
		Kontrolle	50S	35717	5113

23S, 5S und TP 50 wurden 20 Min bei 4 mM(I) und 90 Min bei 20 mM Mg Ac(II) bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und auf Poly(Phe)-Synthese und Peptidyltransferaseaktivität geprüft.

Die Rekonstitution bei 44 °C im ersten Schritt zeigte bessere Aktivität (Tabelle XII) als bei der durch Interpolation aus Abb. 11 geschätzten Temperatur von 40°C.

Um dieses Ergebnis experimentell zu bestätigen, wurde die erste Inkubation bei Mg Ac-Konzentrationen zwischen 2 und 10 mM und Temperaturen zwischen 35°C und 55°C durchgeführt (Abb. 19).

Abb. 19: Bestimmung der Temperatur- und Mg^{++}-Optima für den ersten Schritt der zweistufigen Totalrekonstitution



Im ersten Schritt wurde 30 Min bei verschiedenen Temperaturen (35°C - 55°C) und den angegebenen Mg Ac-Konzentrationen inkubiert; anschließend folgte die zweite Inkubation (60 Min) bei 50°C und 20 mM Mg Ac.

Aus diesen Experimenten haben sich folgende Bedingungen als optimal für die Totalrekonstitution der 50S Untereinheit von E.coli Ribosomen erwiesen:

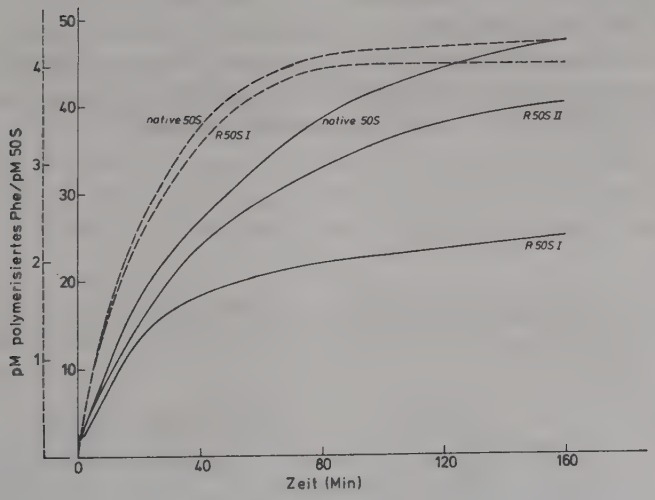
1. Stufe 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 400 mM NH_4Cl
   4 mM Mg Ac
   Inkubation: 20 Min bei 44°C

2. Stufe 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 400 mM NH_4Cl
   20 mM Mg Ac
   Inkubation: 90 Min bei 50°C.

Sowohl die Mg^{++}-Konzentration als auch die Rekonstitutionstemperatur müssen nach der ersten Inkubation verändert werden, um voll aktive R50S zu erhalten. Wird nur ein Parameter verändert, führt die Rekonstitution zu Partikeln mit verminderten Aktivitäten (Abb. 12; Tabelle XII).

Die in Tabelle XI beschriebenen Aktivitäten betrugen rund 50 % im Vergleich zu nativen Untereinheiten, eine Ausnahme bildete die Poly(Phe)-Syntheseaktivität mit 109 %. Abbildung 20 demonstriert den Grund für diesen Unterschied.

Abb. 20: Kinetiken der Poly(Phe)-Synthese von rekonstituierten Partikeln und nativen 50S Untereinheiten



Aktivitäten von zweistufig rekonstituierten Partikeln (R50S I: 40°C ⟶ 50°C; II: 44°C ⟶ 50°C) im Vergleich zu nativen 50S. Die Kinetiken der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese wurden bei ungesättigten

(150 pM) und gesättigten (70 μM) Phe-Konzentrationen durchgeführt.

Bei ungesättigten (Phe)-Konzentrationen im Poly(U)-Ansatz sind die Kinetiken von rekonstituierten Partikeln I` (40°C ⟶ 50°C) und 50S nicht zu unterscheiden; 100 % Aktivität werden erreicht. Im Falle des gesättigten Aminosäureangebots haben die R50S I nur rund 50 % Aktivität in Übereinstimmung mit den bei anderen Tests erhaltenen Werten (Tabelle XI). Die durch Inkubation bei 44°C ⟶ 50°C hergestellten R50S II zeigen ungefähr 80 % der Syntheseaktivität von nativen Untereinheiten. Diese geringe Veränderung der Inkubationstemperatur von 44°C anstelle von 40°C in der ersten Stufe verbesserte die Aktivitätsausbeute beträchtlich. Die Aktivitäten der durch die verfeinerte Rekonstitution gewonnenen R50S Partikel in einer Vielzahl von ribosomalen Funktionstests werden später beschrieben, und es wird sich zeigen, daß die rekonstituierten Partikel nativen 50S Untereinheiten in allen getesteten Funktionen kaum nachstehen.

3.4. Zweistufige Rekonstitution von ribosomalen 50S Untereinheiten anderer E.coli Stämme

RNS und Proteine wurden aus ribosomalen 50S Untereinheiten vom Stamm MRE 600, der wie A 19 Ribonuclease I^- ist, und von EA_2, einem Ribonuclease I^+-Stamm, isoliert und komplementär bzw. kreuzweise rekonstituiert. EA_2-RNS und MRE 600-RNS sowie MRE 600-TP 50 ließen sich in allen Fällen mit A 19-RNS und -TP 50 kombinieren; wenn jedoch EA_2 Proteine bei der Rekonstitution einge-

setzt wurden, ergab sich eine nur geringe Aktivität der Partikel im Poly(Phe)-Synthesetest (Tabelle XIII).

Tabelle XIII: Rekonstitution von ribosomalen Komponenten aus verschiedenen E.coli Stämmen

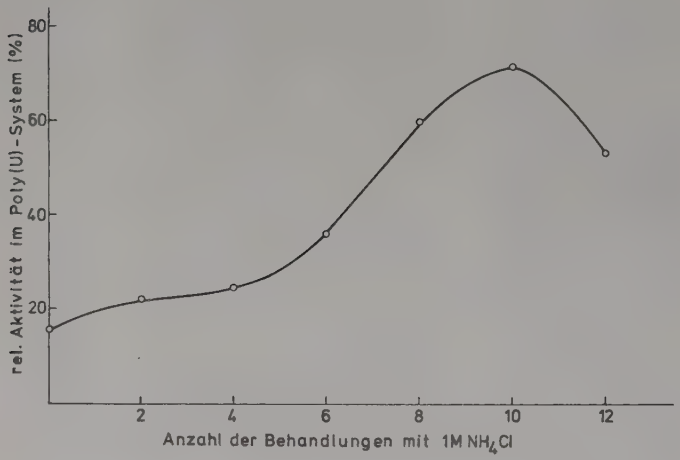
RNS von	Proteine von	Poly(Phe)-Synthese %
A19	A19	87
A19	MRE600	78
A19	EA_2	2
MRE600	A19	80
MRE600	MRE600	71
MRE600	EA_2	2
EA_2	A19	94
EA_2	MRE600	47
EA_2	EA_2	2
Kontrolle	50S	100 (25.738 cpm)

Die Präparationen wurden wie bei weiteren Versuchen zweistufig unter optimalen Bedingungen rekonstituiert.

Die 23S RNS war nach der Rekonstitution mit TP 50 von EA_2 vollständig zerstört, wofür offensichtlich die an den Ribosomen haftende Ribonuclease I verantwortlich war.

Durch suksessives Waschen der 50S von EA_2 mit 1 M NH_4Cl-enthaltenden TMNSH-Puffer wurde versucht, die RNase von der Untereinheit zu entfernen. Nach jeweils zweimaligem Waschen wurde die TP 50 Fraktion isoliert und mit 23S und 5S RNS von A 19 rekonstituiert. Abb. 21 zeigt, daß die Proteine von zehnmal gewaschenen EA_2 50S Untereinheiten hoch aktiv in der Rekonstitution sind; der Abfall der Aktivität nach zwölf Waschbehandlungen kann auf das miteinhergehende Abwaschen von essentiellen ribosomalen Proteinen zurückgeführt werden.

Abb. 21: Abhängigkeit der Aktivität der EA_2-TP 50 Proteinfraktion von der Anzahl der NH_4Cl-Waschbehandlungen



Die 50S Untereinheiten von EA_2 wurden nach jeder Waschung (2 Std/0°C) mit PEG 6000 ausgefällt, abzentrifugiert (30 Min/30.000 g) und wieder in 1 M NH_4Cl-Puffer aufgenommen. Von unbehandelten und 2, 4, 6, 8, 10 und 12mal gewaschenen 50S wurden die Proteine vorbereitet und mit RNS von A 19 rekonstituiert. Die Aktivitäten im Poly(U)-Ansatz sind in von Hundert der Kontrollrekonstitution von A 19-RNS mit A 19-TP 50 angegeben.

Ein vergleichbarer Effekt wurde durch einmaliges Waschen der Untereinheiten in einem Lithiumchloridpuffer erreicht.

Die 50S Untereinheiten von EA_2 (15 A_{260}-Einheiten/ml) wurden entweder 5 Std bei 0^oC in 0,6 M LiCl enthaltenden TM-Puffer inkubiert und durch PEG 6000-Fällung gewonnen oder 2 Std bei 0^oC gehalten und durch dreistündige Ultrazentrifugation bei 150.000 g isoliert. Die von so behandelten EA_2 50S Untereinheiten präparierte TP 50 Fraktion konnte mit 23S und 5S RNS zu aktiven Partikeln rekonstituiert werden (Tabelle XIV).

Tabelle XIV: Rekonstitution mit der TP 50 Fraktion von EA_2-Ribosomen

RNS von	TP 50 von	Poly(Phe)-Synthese	%
A19	A19		74
A19	EA_2		8
A19	EA_2(0,6 M LiCl)		53
Kontrolle	50S		100 (25.495 cpm)

3.5. Rekonstitutionsfähigkeit der ribosomalen Proteine in Abhängigkeit vom Erntepunkt der Bakterienzellen

Die ribosomalen Proteine vom Stamm A 19 aus verschiedenen Fermentationen zeigten bemerkenswerte Abweichungen in ihrem Rekonstitutionsvermögen. Darum wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Erntepunkt der Bak-

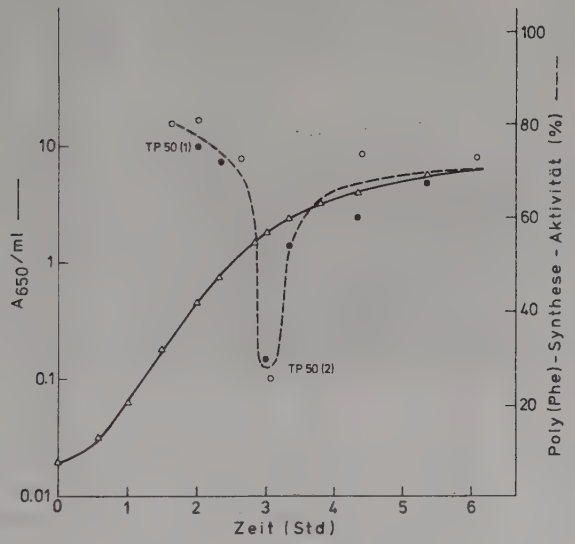
terien und der Rekonstituierbarkeit ihrer ribosomalen Komponenten untersucht.

E.coli Bakterien vom Stamm A 19 wurden in einem 50 l fassenden Fermenter (New Brunswick) kultiviert. Nach verschiedenen Zeiten (0 - 6 Std) wurde das Wachstum der Zellen durch Absorptionsbestimmung bei 650 nm Wellenlänge gemessen und einige Liter aus dem Fermenter entnommen. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (10 Min/16.000 g); die ribosomalen Untereinheiten wurden isoliert, und RNS und Proteine von 50S wurden vorbereitet.

Sämtliche 50S Untereinheiten zeigten die gleichen Aktivitäten im Poly(Phe)-Synthesetest. Auch die verschiedenen RNS-Präparationen konnten mit derselben TP 50 Präparation zu gleich aktiven Partikeln rekonstituiert werden. Die verschiedenen TP 50 Präparationen beeinflußten jedoch die Aktivität bei Rekonstitution mit einheitlichen 23S und 5S RNS beträchtlich.

In Abb. 22 sind die Aktivitäten der aus RNS und verschiedenen TP 50 rekonstituierten Partikeln in Abhängigkeit vom Erntepunkt aufgetragen. Die Rekonstitution mit ribosomalen Proteinen aus in semilogarithmischer Wachstumsphase geernteten Zellen (TP 50(2)) zeigt einen starken Aktivitätsabfall, wohingegen die Proteine aus in früher (TP 50(1)) und in später logarithmischer Wachstumsphase geernteten Zellen zu voll aktiven Partikeln rekonstituierbar sind.

Abb. 22: Zusammenhang von Erntepunkt der Bakterien und Rekonstituierbarkeit ihrer 50S-Proteine mit einheitlicher RNS



E.coli A 19 Bakterien wurden in einem Fermenter aufgezogen. Nach den angegebenen Zeiten wurde eine Probe entnommen. Die Absorption bei 650 nm wurde als Maßstab des Zellenwachstums gewählt und in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer aufgetragen. Die Poly(Phe)-Syntheseaktivitäten der von verschiedenen TP 50 rekonstituierten Partikel aus zwei unabhängigen Experimenten (o---o; •---•) wurden in von Hundert von nativen 50S aufgezeichnet.

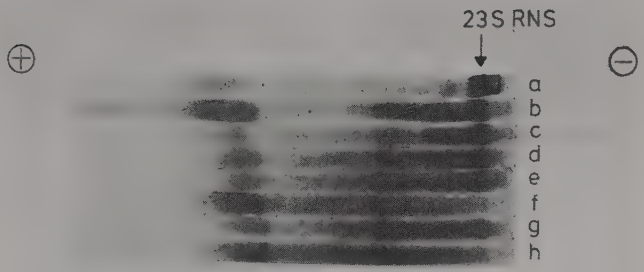
Die RNS-Gelelektrophorese zeigte, daß die Partikel aus RNS und Proteinen von Bakterien der semilogarithmischen Phase im Gegensatz zu den aktiveren Partikeln zerstörte 23S RNS enthielten. Es war daher anzunehmen, daß eine Ribonuclease während der semilogarithmischen Wachstumsphase an den 50S Untereinheiten haftete und die 23S RNS während der Rekonstitution degradierte.

50S Untereinheiten aus semi- (50S(2)) und früh-(50S(1))-logarithmischer Phase wurden in 0,6 M-LiCl-Puffer gewaschen. Die Proteine der behandelten Untereinheiten (TP $50_{0,6}$(1); TP $50_{0,6}$(2)) und die abgewaschenen Oberstandsproteine (sp 0,6(1); sp 0,6(2)) wurden gewonnen. TP $50_{0,6}$(1) und TP $50_{0,6}$(2) waren nach Rekonstitution mit RNS im Poly(Phe)-Synthesesystem etwa gleich aktiv (Tabelle XV) im Gegensatz zu TP 50(1) und TP 50(2) (Abb. 22). Wie vermutet, verminderte die Zugabe von sp 0,6(2) zu der Rekonstitution mit TP $50_{0,6}$(1) oder (2) die Aktivität deutlich, der Zusatz von sp 0,6(1) hatte kaum einen Einfluß. Die RNS der Partikel war in Obereinstimmung mit diesem Befund nur dann zerstört, wenn die sp 0,6(2) Fraktion zugegeben wurde (Abb. 23).

Tabelle XV: Rekonstitution mit TP 50 und Oberstandsproteinen von mit 0,6 M LiCl behandelten 50S Untereinheiten aus verschiedenen Wachstumsphasen

RNS	Proteine		Poly(Phe)-Synthese %
23S + 5S	TP$50_{0,6}$(1)	-	67
23S + 5S	TP$50_{0,6}$(1)	sp 0,6(1)	53
23S + 5S	TP$50_{0,6}$(1)	sp 0,6(2)	17
23S + 5S	TP$50_{0,6}$(2)	-	47
23S + 5S	TP$50_{0,6}$(2)	sp 0,6(1)	32
23S + 5S	TP$50_{0,6}$(2)	sp 0,6(2)	9
Kontrolle		50S	100 (23.370cpm)

Abb. 23: RNS-Gelelektrophorese nach Rekonstitution mit den verschiedenen Proteinfraktionen



RNS-Banden nach Gelelektrophorese von nicht (a) und inkubierter (b) 23S RNS und von Rekonstitutionspartikeln aus RNS und

c) TP $50_{0,6}(1)$
d) TP $50_{0,6}(2)$
e) TP $50_{0,6}(1)$ + sp 0,6(1)
f) TP $50_{0,6}(1)$ + sp 0,6(2)
g) TP $50_{0,6}(2)$ + sp 0,6(1)
h) TP $50_{0,6}(2)$ + sp 0,6(2).

3.6. Rekonstitution von RNS und Proteinen der 50S Untereinheiten von Bacillus stearothermophilus

Die von Nomura und Erdmann (1970) für Ribosomen des thermophilen Bakteriums Bacillus stearothermophilus beschriebene einstufige Totalrekonstitution wurde in dem folgenden Experiment mit der hier vorgestellten Zweistufen-Rekonstitution verglichen. Dabei wurden B. stearothermophilus und E.coli Proteine und RNS vorbereitet und sowohl homolog als auch heterolog unter beiden Bedingungen miteinander rekonstituiert (Tabelle XVI).

Tabelle XVI: Homologe und heterologe Rekonstitutionen mit ribosomalen Komponenten aus E.coli und B.stearothermophilus

Rekonstitutionskomponenten

RNS	TP 50	einstufige Rekonstitution Poly(Phe)-Synthese	einstufige Rekonstitution Peptidyl-transferase	zweistufige Rekonstitution Temperatur der zweiten Inkubation 60°C Poly(Phe)-Synthese	60°C Peptidyl-transferase	50°C Poly(Phe)-Synthese	50°C Peptidyl-transfer.
		cpm		cpm		cpm	
E.coli	E.coli	31	2	1.278	879	11.018 (72.950)	6.435
	B.st.	146	76	1.523	481	1.867 (53.399)	632
B.st.	E.coli	524	278	385	527	576 (21.424)	639
	B.st.	3.090	1.404	4.739	3.932	2.321 (73.580)	1.670

Kontrollen		E.coli	50S
		21.340 (73.840)	20.369
B.st.	50S	21.772	19.856

Die RNS und Proteine wurden wie unter Methoden beschrieben vorbereitet, nur wurde die B.stearothermophilus RNS durch fünfmalige Phenolextraktion aus den Untereinheiten gewonnen. Diese Behandlung entfernte alle ribosomalen Proteine von der RNS.

Bei der Rekonstitution nach Nomura und Erdmann zeigten nur B.stearothermophilus RNS und TP 50, homolog rekonstituiert, deutliche Aktivitäten im Poly(U)-Ansatz und im Fragment-Test, doch konnte das Ergebnis bei dieser Kombination durch Anwendung der zweistufigen Rekonstitution (2. Inkubation bei 60°C) noch verbessert werden (Faktor 1.5-2.5). E.coli Proteine und RNS waren ausschließlich durch die hier entwickelte Methode (2. Inkubation bei 50°C) rekonstituierbar. Alle kreuzweisen Kombinationen (E.coli/B.stearothermophilus) zeigten geringe Aktivitäten, wobei auch hier die Zweistufeninkubation in jedem Falle von Vorteil war. Die minimalen Aktivitäten im Test bei gesättigten (Phe)-Konzentrationen erwiesen sich im Poly(U)-Ansatz bei ungesättigtem Aminosäureangebot als signifikant (Werte in Klammern).

3.7. *In vitro* Aufbau der 50S Untereinheit von E.coli Ribosomen

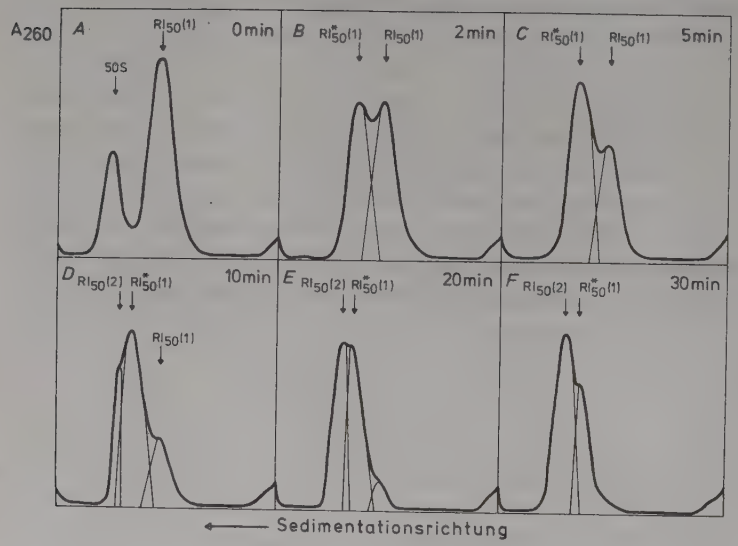
Die zwei Stufen der Totalrekonstitution können zwei Klassen ribosomaler Bestandteile widerspiegeln, die unterschiedliche Rekonstitutionsbedingungen für einen geordneten Wiederaufbau des Ribosoms in vitro benötigen. Es wurde die Frage untersucht, ob während der Rekonstitution definierte Rekonstitutionszwischenprodukte (RI_{50}-Partikel) auftreten, deren Synthese von den verschiedenen Inkubationsbedingungen abhängig ist.

Für den ersten (44°C/4 mM Mg^{++}) und den zweiten Rekonstitutionsschritt (50°C/20 mM Mg^{++}) wurden Kinetikstudien angestellt, wobei nach verschieden langer Inkubation von 23S RNS, 5S RNS und TP 50 jeweils ein Aliquot entnommen, sofort im Eisbad abgekühlt und durch Sucrosegradientenzentrifugation analysiert wurde (Abb. 24; Abb. 25).

3.7.1. Analyse der ersten Rekonstitutionsstufe

Während der ersten Rekonstitutionsstufe erscheinen nacheinander drei definierte Partikel (Abb. 24, A-F).

Abb. 24: Absorptionsprofile der während der ersten Inkubation (44°C/4 mM Mg^{++}) gebildeten Rekonstitutionszwischenprodukte



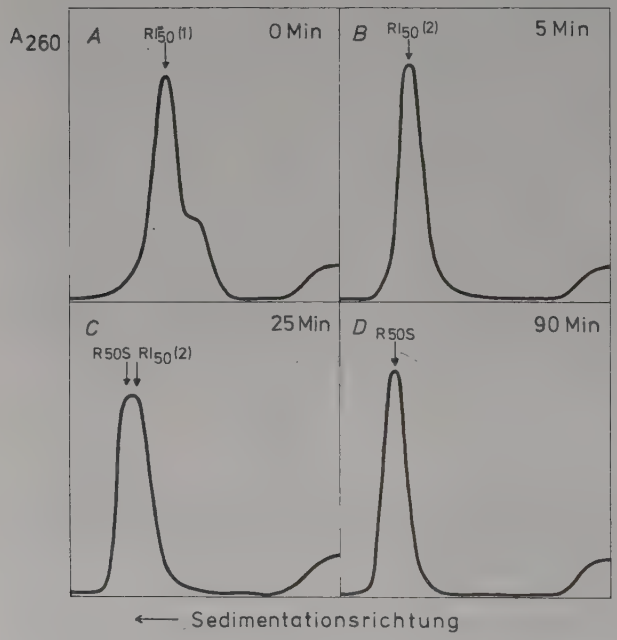
Nach den angezeigten Zeiten wurde jeweils ein Aliquot mit 2 Äquivalenzeinheiten Partikel dem Rekonstitutionsansatz entnommen, auf einen 4-20 %igen Sucrosegradienten in Rekonstitutionspuffer (4 mM Mg Ac) aufgetragen und für 5 Std bei 160.000 g und 4°C in einem SW 40 Rotor zentrifugiert. Die aufgetreteten Rekonstitutionszwischenprodukte sind mit $RI_{50}(1)$, $RI^{*}_{50}(1)$ und $RI_{50}(2)$ bezeichnet. Bei der Analyse nach 0 Min Inkubation (Abb. 24, A) sind zu der Probe außerdem 0,5 A_{260}-Einheiten 50S als Kontrolle zugegeben worden.

Ohne Inkubation von RNS und Proteinen ($0^{o}C$/4 mM Mg^{++}) zeigte sich ein leichteres Partikel ($RI_{50}(1)$) als schmaler, symmetrischer Gipfel (Abb. 24, A). Nach dem Start der Inkubation nimmt der leichte Gipfel ab, und ein zweiter Gipfel ($RI^{*}_{50}(1)$) erscheint und vergrößert sich mit zunehmender Inkubationsdauer (Abb. 24, B-C). Schließlich tritt als ein dritter Gipfel ein schwereres Partikel ($RI_{50}(2)$) auf, auf das nach 30 Min Inkubation bei $44^{o}C$ und 4 mM Mg Ac rund 3/4 der gesamten Partikelpopulation entfällt. Wie sich später zeigen wird, enthalten das erste und das zweite Rekonstitutionszwischenprodukt das gleiche Proteinmuster und unterscheiden sich nur in ihrer Konformation, sie werden daher mit $RI_{50}(1)$ bzw. $RI^{*}_{50}(1)$ bezeichnet; das dritte Partikel $RI_{50}(2)$ besitzt mehr Proteine und eine andere Konformation.

3.7.2. Untersuchung des zweiten Rekonstitutionsschritts

Bei der vergleichbaren Analyse des zweiten Schritts der zweistufigen Inkubation wurden 23S und 5S RNS und TP 50 für 8 Min bei $44^{o}C$ und 4 mM Mg Ac inkubiert, das erhaltene $RI^{*}_{50}(1)$ -Partikel wurde anschließend 0 Min, 5 Min, 25 Min und 90 Min bei $50^{o}C$ und 20 mM Mg Ac inkubiert (Abb. 25, A-D; Tabelle XVII).

Abb. 25: Absorptionsprofile der während der zweiten Rekonstitutionsstufe (50°C/20 mM Mg^{++}) gebildeten Produkte



23S RNS, 5S RNS und TP 50 wurden 8 Min bei 44°C inkubiert, anschließend wurde der Ansatz bei 50°C und 20 mM Mg Ac inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde ein Aliquot von 2 Äquivalenzeinheiten entnommen und mittels Zuckergradientenzentrifugation analysiert (4-20 % Sucrose in Rekonstitutionspuffer (20 mM Mg Ac); 5 Std/160.000 g im SW 40 Rotor).

Tabelle XVII: Poly(Phe)-Syntheseaktivitäten der im zweiten Schritt hergestellten Partikel (s. Abb. 25)

	Inkubationsdauer im zweiten Schritt	Poly(Phe)-Synthese cpm	% im Vergleich zu R50S
A	0 Min	544	0,1
B	5 Min	3.922	13
C	25 Min	18.954	62
D	90 Min	30.276	100
Kontrollen	30S	507	
	30S + 50S	33.382	

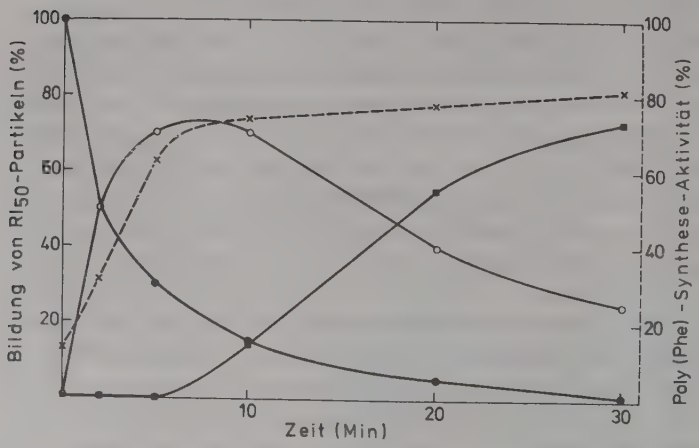
Abb. 25 zeigt, daß während des zweiten Rekonstitutionsschritts außer den oben beschriebenen keine weiteren RI_{50}-Partikel auftreten. $RI^*_{50}(1)$ ist schon nach 5 Min Inkubation bei 50°C vollständig in $RI_{50}(2)$ überführt (Abb. 25, B), wohingegen die Bildung von R50S aus $RI_{50}(2)$ die 90minütige Inkubation im zweiten Schritt benötigt (Abb. 25, C-D; Tabelle XVII). Da die $RI_{50}(2)$- und R50S-Partikel im Sucrosegradientenprofil nur schwer zu unterscheiden waren, wurden die Poly(Phe)-Syntheseaktivitäten der Partikel als Maß für die Bildung von R50S verwandt. Erst nach 90 Min Inkubation zeigten die Partikel volle Aktivität, nach 5 Min Inkubation waren nur etwa 10 % aktive Partikel entstanden.

Die Kinetikstudie verdeutlicht, daß $RI^*_{50}(1)$ bei 4 mM Mg Ac und 44°C aus $RI_{50}(1)$ hervorgeht und für die Bildung von $RI_{50}(2)$ erforderlich ist. $RI_{50}(2)$ wird schließlich bei 20 mM Mg Ac und 50°C in aktive R50S umgewandelt. Die Rekonstitution der 50S Unter-

einheit erfolgt somit über 3 Zwischenprodukte:
$RI_{50}(1) \longrightarrow RI^{*}_{50}(1) \longrightarrow RI_{50}(2) \longrightarrow R50S$.
Die Bildung von R50S aus $RI_{50}(2)$ erfordert dabei die höchste Inkubationstemperatur und die längste Inkubationsdauer (90 Min/50°C) im Vergleich zur Bildung von $RI^{*}_{50}(1)$ aus $RI_{50}(1)$ (8 Min/44°C) und $RI_{50}(2)$ aus $RI^{*}_{50}(1)$ (30 Min/44°C oder 5 Min/50°C).

Alle drei Zwischenprodukte sind vollkommen inaktiv bei Peptidbindungstests; werden jedoch die Proben nach verschieden langer Inkubation im ersten Schritt einer konstanten zweiten Inkubation (90 Min) bei 50°C und 20 mM Mg Ac unterzogen, zeigt sich ansteigende Poly(Phe)-Syntheseaktivität, die einhergeht mit der Bildung von $RI^{*}_{50}(1)$ und dem Abbau von $RI_{50}(1)$ während der ersten Inkubationsstufe (Abb. 26).

Abb. 26: Auftreten der Rekonstitutionszwischenprodukte im Verlauf der ersten Inkubation der zweistufigen Rekonstitution



Die Flächen unter den Gipfeln aus Abb. 24 wurden abgeschätzt und den RI_{50}-Partikeln zugeordnet. Sie wurden als Maß für die Partikelmenge gewählt und in % zu der Gesamtfläche gegen die Inkubationsdauer aufgetragen. •—• $RI_{50}(1)$; o—o $RI^*_{50}(1)$; ▪—▪ $RI_{50}(2)$. x-x-x bezeichnet die Aktivitäten der Partikel im Poly(Phe)-Synthesesystem bei gesättigter (Phe)-Konzentration nach einer zweiten 90minütigen Inkubation bei 50°C und 20 mM Mg Ac.

Wenn $RI_{50}(1)$ vollständig in $RI^*_{50}(1)$ überführt ist, erreichen die Partikel die höchste Aktivität. Die Bildung von $RI_{50}(2)$ aus $RI^*_{50}(1)$ während der ersten Inkubation beeinflußt die Aktivität nicht. Man kann folgern, daß $RI_{50}(2)$ sowohl im ersten Schritt als auch in der zweiten Stufe der Rekonstitution gebildet werden kann, wohingegen der parallele Anstieg von Aktivität und $RI^*_{50}(1)$-Auftreten anzeigt, daß $RI^*_{50}(1)$ nur unter den Bedingungen der ersten Inkubation gebildet werden kann und für die Bildung von aktiven 50S Partikeln notwendig ist.

3.7.3. Isolierung und Charakterisierung der RI_{50}-Partikel

Um die Rekonstitutionszwischenprodukte genauer zu charakterisieren, wurden die Partikel nach folgendem Schema hergestellt und durch PEG 6000-Fällung bzw. Ultrazentrifugation isoliert:

$$\text{23S RNS + 5S RNS + TP 50} \xrightarrow{4\text{ mM/0°C}} RI_{50}(1)$$

$$RI_{50}(1) \xrightarrow{4\text{ mM/44°C}} RI^*_{50}(1)$$

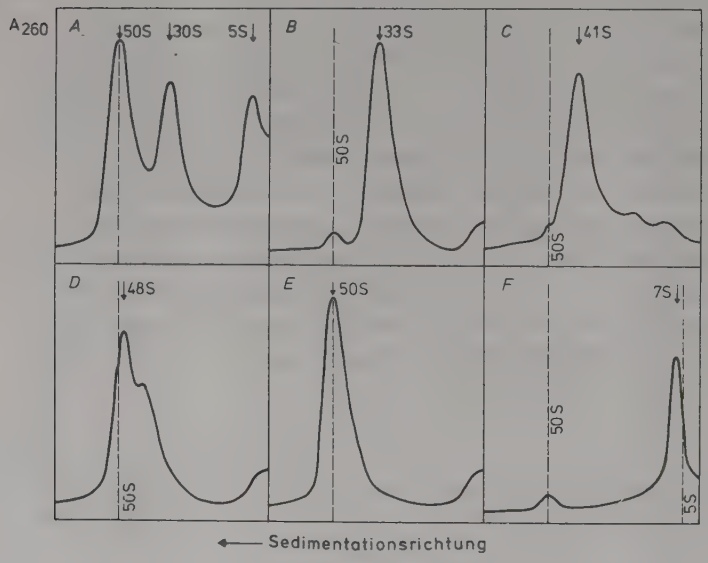
$$RI^*_{50}(1) + \text{TP 50} \xrightarrow{4\text{ mM/44°C}} RI_{50}(2)$$

$$RI_{50}(2) \xrightarrow{20\text{ mM/50°C}} \text{R50S}\ .$$

Die Mg Ac-Konzentrationen und die Temperaturen sind auf den Pfeilen angezeigt; die NH_4Cl-Konzentration war durchgehend 400 mM.

Alle Partikel unterscheiden sich in ihrem Sedimentationsverhalten (Abb. 27, B-E).

Abb. 27: Sedimentationsverhalten von nativen Untereinheiten und Rekonstitutionspartikeln



Die Absorptionsprofile von 50S und 30S Untereinheiten und 5S RNS (A) und rekonstituierten Partikeln (B-F) wurden nach Sucrosegradientenzentrifugation erhalten (s. Legende zu Abb. 24). Jeweils 2 A_{260}-Einheiten $RI_{50}(1)$ (B), $RI^{*}_{50}(1)$ (C), $RI_{50}(2)$ (D) und R50S (E)

und 0,6 A_{260}-Einheiten zweistufig rekonstituierte (5S RNS + TP 50)-Partikel wurden auf den Gradienten aufgetragen (F). Jede Probe enthielt außerdem 0,1 A_{260}-Einheiten ^{3}H-markierte 50S, die als kleiner Absorptionsgipfel erscheinen und deren cpm-Gipfel durch die gestrichelte Linie markiert sind. Die S-Werte wurden nach Mc Ewen (1967) berechnet.

$RI_{50}(1)$ hat einen S-Wert von rund 33S. Die Hitzeaktivierung bei 44°C führt zu $RI^{*}_{50}(1)$, welches bei 41S sedimentiert. Nach Inkubation von $RI^{*}_{50}(1)$ mit TP 50 erhält man $RI_{50}(2)$ mit einem S-Wert von 48S. Wurden die Proteine bei 0°C zugegeben und erfolgte keine Inkubation, veränderte sich der S-Wert von $RI^{*}_{50}(1)$ nicht, obwohl die entstandenen Partikel nach PEG 6000-Fällung alle ribosomalen Proteine enthielten, die aber nach Ultrazentrifugation durch ein Sucrosekissen abgewaschen waren. Die Inkubation während des Schritts $RI^{*}_{50}(1) \longrightarrow RI_{50}(2)$ war notwendig, um einerseits die Proteine fest zu binden und andererseits die Konformationsänderung zu bewirken. Die Ausbeute des $RI_{50}(2)$ war geringer, wenn von $RI^{*}_{50}(1)$ aus gestartet wurde ($\sim$30 % Umformung). Wenn 23S RNS, 5S RNS und TP 50 bei 44°C und 4 mM Mg Ac inkubiert wurden, ließ sich die Ausbeute auf rund 80 % des Ausgangsmaterials steigern.

Die Konformationsänderung von 48S nach 50S konnte ausschließlich durch die Inkubation des $RI_{50}(2)$ bei 50°C und 20 mM Mg Ac erreicht werden. Während dieses Schritts, der zur Bildung von aktiven R50S führte, wurden keine Proteine und keine 5S RNS zugegeben.

Die Isolierung der Partikel erfolgte durch PEG-Fällung und durch Ultrazentrifugation durch ein Sucrosekissen, zwei verschiedene Techniken, die den Proteingehalt der Partikel beeinflußten. Wegen der geringen Scherkräfte während der Zentrifugation (30 Min/30.000 g)

bei der PEG-Methode, bleiben auch relativ schwach gebundene Proteine an den Partikeln haften; ungebundene Proteine werden jedoch nicht ausgefällt. Während der Ultrazentrifugation (18 Std/80.000 g) durch das Sucrosekissen werden schwach gebundene Proteine abgetrennt; die isolierten Partikel enthalten dann nur die fest gebundenen Proteine.

Tabelle XVIII, Exp. 1 zeigt die Proteingehalte der verschiedenen Partikel.

Legende zu Tabelle XVIII: Proteingehalt von rekonstituierten Partikeln
Nach der Rekonstitution wurden die Partikel durch PEG-Fällung oder durch Ultrazentrifugation durch eine Sucroselösung isoliert. Im zweiten Fall wurden 25 ml des Rekonstitutionsansatzes auf 10 ml 40 %ige Sucrose in Rekonstitutionspuffer aufgetragen und in einem Beckman SW 27 Rotor für 18 Std bei 80.000 g zentrifugiert. Die Partikel wurden in Rekonstitutionspuffer aufgenommen. Die Proteine von jeweils 100 A_{260}-Einheiten der Partikel wurden in der 2D-Gelelektrophorese analysiert. Bei der Synthese von 5S RNS Protein-Komplexen wurden 45 A_{260}-Einheiten 5S RNS mit 200 Äquivalenzeinheiten (eU) TP 50 inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze zentrifugiert (15 Min/30.000 g), um unlösliche Produkte zu entfernen. Die Partikel wurden durch Ultrazentrifugation (24 Std/130.000 g) sedimentiert. Sie wurden in Rekonstitutionspuffer resuspendiert. Die Proteine von 12 A_{260}-Einheiten wurden in der 2D analysiert.

Der Proteingehalt der Partikel wurde im Vergleich zu nativen 50S abgeschätzt:

+	normale Proteinmenge
(+)	verminderte Proteinmenge
(±)	Protein in Spuren sichtbar
-	Protein nicht vorhanden.

Tabelle XVIII: Proteingehalt von rekonstituierten Partikeln

Exp. Nr.	Rekonstitution Komponenten	Bedingung (Temp./Mg^{++})	Partikel	Isolierung	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8/9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L32	L33
1	23S+5S RNS + TP 50	0°/4 mM	RI_{50}(1)	PEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+
				Sucrose	+	+	+	(+)	+	(±)	(+)	+	+	+	(+)	+	(+)	(±)	(±)	+	(+)	+	+	+	+	+	+	(±)	(+)	-	(±)	+	-	-	+
	23S+5S RNS + TP 50	44°/4 mM	RI_{50}(2)	PEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
				Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+
2	23S RNS + TP 50	0°/4 mM	I	PEG	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	(±)	+	+
				Sucrose	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	(+)	+	(±)	(+)	(±)	(+)	+	+	(+)	+	(±)	+	-	-	+	-	-	+
	23S RNS + TP 50	44°/4 mM	II	PEG	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	(+)	+	+
				Sucrose	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	(+)	+	(±)	+	(+)	+	+	+	+	+	(±)	+	(±)	+	+	+	+	+	+
	23S RNS + TP 50	zweistufig	III	PEG	+	+	+	+	(±)	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+
				Sucrose	+	+	+	+	(±)	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)	+	(±)	+	+	+	+	+	(±)	(+)	+	+	+	+	+	+	+
3	5S RNS + TP 50	0°/4 mM			(±)	+	(+)	-	+	(±)	(+)	(±)	(±)	(±)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(±)	(±)	(±)	+	(±)	(±)	(+)	(±)	(±)	(±)	(±)
	5S RNS + TP 50	44°/4 mM			(±)	+	(±)	-	(+)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	-	(±)	(±)	(±)	+	(±)	-	-	(±)	-	(±)	+	(±)	(±)	(±)	-	-	-	-
	5S RNS + TP 50	zweistufig			(±)	+	(±)	-	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	-	(±)	(±)	-	(±)	-	-	+	(±)	-	-	(±)	-	(±)	+	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	-	-

Oberraschenderweise besitzen die durch PEG-Präzipitation gewonnenen $RI_{50}(1)$-Partikel alle 50S-Proteine. Wenn die $RI_{50}(1)$-Partikel durch Sucrose abzentrifugiert worden waren, enthielten sie jedoch nur 18 Proteine in normalen Mengen, festgebundene Proteine: L1, L2, L3, L5, L8, L9, L10, L11, L13, L17, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L29, L33. Acht weitere Proteine waren nicht oder nur in Spuren zu finden, schwach gebundene Proteine: L6, L15, L16, L25, L27, L28, L30, L32. Die sechs Proteine L4, L7, L12, L14, L18, L26 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden, da sie bei verschiedenen Präparationen in unterschiedlichen Mengen auftraten. Nicht untersucht wurden die Proteine L31 und L34, da sie selbst im 2D-Proteinmuster der Kontroll-TP 50 nicht zu erkennen waren. Das $RI^*_{50}(1)$-Partikel entsprach in seinem Proteingehalt dem $RI_{50}(1)$-Partikel.

Die $RI_{50}(2)$-Partikel enthielten sowohl nach PEG-Fällung als auch nach der Ultrazentrifugation sämtliche 50S-Proteine. Die 30minütige Inkubation bei 44°C und 4 mM bewirkte die feste Bindung aller Proteine an die ribosomale RNS.

Im Poly(Phe)-Synthesetest sind die Partikel $RI_{50}(1)$, $RI^*_{50}(1)$ und $RI_{50}(2)$ inaktiv (Tabelle XIX). Werden sie jedoch unter Rekonstitutionsbedingungen inkubiert, zeigen alle RI_{50}-Partikel deutliche Aktivitäten.

Tabelle XIX: Poly(Phe)-Syntheseaktivitäten von Rekonstitutionspartikeln (R50S- und RI_{50}-Partikel)

Rekonstitutionspartikel	Isolation	Inkubation der Partikel bei Zugabe von			Poly(Phe)-Syntheseaktivität %
		Bedingung	5S RNS	TP 50	
RI_{50}(1)	PEG	nicht inkubiert	-	-	<1
		90Min/50°C	-	-	6,4
			+	-	6,2
			-	+	3,7
			+	+	3,3
		zweistufig inkubiert	-	-	61
			+	-	63
			-	+	19
			+	+	22
	Sucrose	nicht inkubiert	-	-	<1
		90Min/50°C	-	-	3,9
			+	-	4,2
			-	+	4,5
			+	+	5,1
		zweistufig inkubiert	-	-	12
			+	-	13
			-	+	42
			+	+	39
RI^{*}_{50}(1)	Sucrose	nicht inkubiert	-	-	< 1
		90Min/50°C	-	-	11
			-	+	45
		zweistufig inkubiert	-	-	10
			-	+	48

Rekonstitutions-partikel	Isolation	Inkubation der Partikel bei Zugabe von Bedingung	5S RNS	TP 50	Poly(Phe)-Synthese-aktivität %
RI_{50}(2)	PEG	nicht inkubiert	-	-	<1
		90Min/50°C	-	-	82
			-	+	24
		zweistufig inkubiert	-	-	85
			-	+	25
	Sucrose	nicht inkubiert	-	-	<1
		90Min/50°C	-	-	54
			-	+	35
		zweistufig inkubiert	-	-	77
			-	+	35
R50S	PEG	-	-	-	91
	Sucrose	-	-	-	91
Kontrollen			30S		<1
			30S+50S		100 (29.566cpm)

Die Partikel wurden im Poly(U)-Ansatz bei gesättigten (Phe)-Konzentrationen getestet.

Die Isolierung der Partikel erfolgte durch PEG-Fällung oder durch Ultrazentrifugation durch Sucrose.
Die Aktivitäten der Rekonstitutionspartikel wurden direkt gemessen und nach zusätzlicher einstufiger (90 Min/50°C; 20 mM Mg^{++}) bzw. zweistufiger (20 Min/44°C; 4 mM Mg^{++}, danach 90 Min/50°C; 20 mM Mg^{++}) Inkubation mit und ohne Protein- bzw. 5S RNS-Zugabe.

Die Abhängigkeit von Protein- oder 5S RNS-Zugabe während der Aktivierung läßt Rückschlüsse auf den Protein- und 5S RNS-Gehalt der RI_{50}-Partikel zu.

Das mit PEG 6000 ausgefällte $RI_{50}(1)$ ist ohne weitere Protein- und 5S RNS-Zugabe nach zweistufiger Inkubation hochaktiv (61 % im Vergleich zu nativen 50S), während die zweite Inkubation ($50^{o}C$/20 mM Mg Ac) allein zu sehr geringer Ausbeute führt (6,4 %). Es enthält somit alle Proteine und 5S RNS, benötigt aber die erste Inkubation bei $44^{o}C$ und 4 mM Mg^{++} für seine Aktivierung.

Im Gegensatz dazu zeigt das durch Ultrazentrifugation gewonnene $RI_{50}(1)$, welches nur die festgebundenen Proteine besitzt, eine starke Aktivitätssteigerung (Faktor 3-4) nach Zugabe von TP 50 während der Inkubation. Der Zusatz von 5S RNS bleibt ohne Wirkung, woraus zu schließen ist, daß 5S RNS schon bei $0^{o}C$ und 4 mM Mg Ac fest in $RI_{50}(1)$ eingebaut wird und auch durch die Zentrifugation durch Sucrose nicht abgetrennt werden kann.

Für die Aktivierung des $RI^{*}_{50}(1)$ ist die erste Inkubation nicht mehr erforderlich; ferner müssen während der zweiten Inkubation Proteine zugegeben werden, wenn das Partikel durch Ultrazentrifugation isoliert wurde.

Beide $RI_{50}(2)$-Partikel zeigen hohe Aktivität, wenn sie ohne weitere Zusätze für 90 Min bei $50^{o}C$ und 20 mM Mg Ac inkubiert werden. Sie sind jedoch ohne Inkubation vollkommen inaktiv, obwohl sie alle Strukturelemente der 50S Untereinheit enthalten.

3.7.4. Rekonstitution von 23S RNS mit Proteinen ohne 5S RNS-Zugabe

Vergleichbare Untersuchungen wurden für die Rekonstitution von TP 50 mit der großen ribosomalen RNS (23S RNS) und ohne 5S RNS angestellt. Nach folgendem Schema konnten vier verschiedene Partikel hergestellt werden:

23S RNS + TP 50 $\xrightarrow{0^{o}C;\ 4\ mM}$ Partikel I

Partikel I $\xrightarrow{44^{o}C;\ 4\ mM}$ Partikel I*

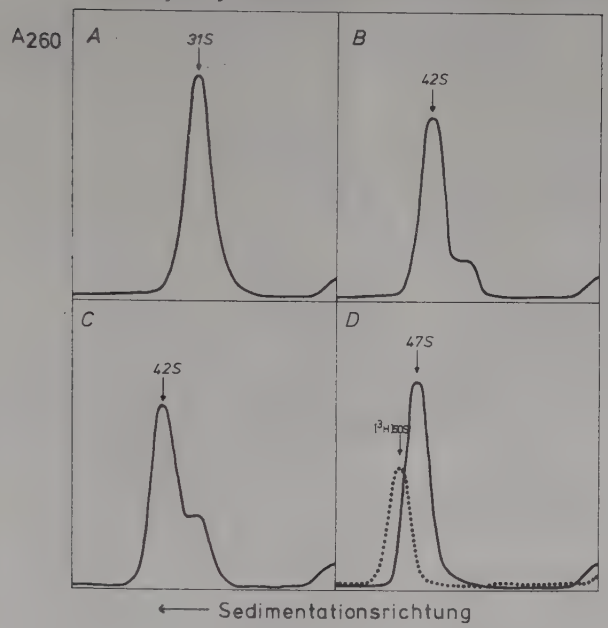
23S RNS + TP 50 $\xrightarrow{44^{o}C;\ 4\ mM}$ Partikel II

23S RNS + TP 50 $\xrightarrow{44^{o}C;\ 4\ mM \longrightarrow 50^{o}C;\ 20\ mM}$ Partikel III.

Die Bezeichnungen auf den Pfeilen zeigen die Mg Ac-Konzentrationen und die Temperaturen an; die NH_4Cl-Konzentration betrug 400 mM.

Die Partikel zeigten ein unterschiedliches Sedimentationsverhalten (Abb. 28, A-D).

Abb. 28: Absorptionsprofile der aus 23S RNS ohne 5S RNS mit TP 50 rekonstituierten Partikel I, I*, II und III



23S RNS und TP 50 wurden 20 Min bei 0°C und 4 mM Mg Ac (A; Partikel I), 20 Min bei 44°C und 4 mM Mg Ac (C; Partikel II) und zweistufig (D; Partikel III) inkubiert, außerdem wurden die isolierten Partikel I 20 Min bei 44°C und 4 mM Mg Ac inkubiert (B; Partikel I*). Jeweils 2 Äquivalenzeinheiten des Rekonstitutionsansatzes wurden im Zuckergradienten analysiert (s. Methoden). Bei D waren 0,1 A_{260}-Einheiten ^{3}H-markierte 50S zugegeben.

Die Partikel I hatten einen S-Wert von 31S (Abb. 28, A), II sedimentierten mit 42S (C) und III bei 47S (D). Die bei 44°C hitzeaktivierten Partikel I* hatten einen Sedimentationskoeffizienten von 42S und entsprachen somit den durch Inkubation von 23S RNS und TP 50 entstandenen Partikeln II.

Die Folge der Konformationsänderungen verläuft analog der Rekonstitution von Proteinen mit 23S RNS und 5S RNS, wobei Partikel I mit $RI_{50}(1)$ und Partikel I* und II mit $RI^{*}_{50}(1)$ vergleichbar sind. Partikel III läßt sich nicht eindeutig dem $RI_{50}(2)$-Partikel oder dem R50S-Partikel zuordnen.

Die Proteingehalte der Partikel I, II und III sind in Tabelle XVIII, Exp. 2 wiedergegeben. Die mit PEG 6000 ausgefällten Partikel I enthielten alle 50S Proteine außer L30. Durch die Ultrazentrifugation durch Sucrose wurden außerdem die Proteine L16, L18, L25, L27 und L32 gänzlich abgelöst. Die nach Ultrazentrifugation erhaltenen Partikel II besaßen mehr L27, L28 und L30, jedoch weniger an Protein L5. Die zweistufig rekonstituierten Partikel III enthielten nach PEG-Präzipitation wie die Partikel II alle ribosomalen Proteine, durch die Sucrosebehandlung wurden aber die Proteine L5, L16, L18 und L25 abgewaschen. Die 5S RNS spielt offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Bindung dieser Proteine, denn wenn 5S RNS während der Rekonstitution enthalten ist, sind sämtliche Proteine nach zweistufiger Inkubation fest gebunden.

Der Aktivitätstest (Tabelle XX) bestätigte den unvollständigen Proteingehalt der Partikel; außerdem konnte der Einbau von 5S RNS verfolgt werden.

Tabelle XX: Aktivitäten der aus 23S RNS und TP 50 ohne 5S RNS rekonstituierten Partikel

Rekonstitutionspartikel	Isolation	Inkubation der Partikel bei Zugabe von		Aktivität im Poly(U)-System %
		Bedingung	5S RNS	TP50	
I	PEG	nicht inkubiert	-	-	< 1
		90Min/50°C	-	-	4
			+	-	11
			-	+	6
			+	+	10
		zweistufig inkubiert	-	-	10
			+	-	57
			-	+	7
			+	+	24
	Sucrose	nicht inkubiert	-	-	< 1
		90Min/50°C	-	-	3
			+	-	4
			-	+	4
			+	+	14
		zweistufig inkubiert	-	-	3
			+	-	9
			-	+	8
			+	+	56
II	PEG	nicht inkubiert	-	-	< 1
		90Min/50°C	-	-	14
			+	-	48
			-	+	12
			+	+	31
		zweistufig inkubiert	-	-	17
			+	-	52
			-	+	13
			+	+	37
	Sucrose	nicht inkubiert	-	-	< 1
		90Min/50°C	-	-	11
			+	-	34
			-	+	14
			+	+	71
		zweistufig inkubiert	-	-	11
			+	-	36
			-	+	17
			+	+	72

Rekonstitutionspartikel	Isolation	Inkubation der Partikel bei Zugabe von			Aktivität im Poly(U)-System %
		Bedingung	5S RNS	TP50	
III	PEG	nicht inkubiert	-	-	20
			+	-	21
		90Min/50°C	-	-	19
			+	-	61
			-	+	18
			+	+	54
	Sucrose	nicht inkubiert	-	-	14
		90Min/50°C	-	-	17
			+	-	38
			-	+	21
			+	+	76
Kontrollen			30S		< 1
			30S+50S		100 (29.566cpm)

Die Poly(Phe)-Syntheseaktivitäten der Partikel I, II und III wurden wie unter Tabelle XIX beschrieben untersucht.

Die Partikel I und II waren im Poly(Phe)-Synthesesystem inaktiv. Die PEG-gefällten Partikel III zeigten, obwohl ohne 5S RNS rekonstituiert, 20 % Aktivität im Vergleich zu nativen 50S. Nach Sucrosezentrifugation war sie jedoch vermindert (14 %), was die Bedeutung der abgewaschenen Proteine anzeigt. Die Partikel I ließen sich nach PEG-Präzipitation durch die zweistufige Inkubation mit 5S RNS und ohne Proteinzugabe aktivieren, wohingegen die durch Sucrose gewaschenen Partikel I sowohl vom 5S RNS- als auch TP 50-Zusatz während der Inkubation abhängig waren. Ohne den ersten Inkubationsschritt (44°C/4 mM Mg Ac) erreichten die Partikel nur sehr geringe Aktivitäten.

Die Aktivierung der Partikel II war ohne die Inkubation bei 44°C möglich; 5S RNS mußte zum Ansatz zugefügt werden, bei den durch Sucrose zentrifugierten Partikeln II zusätzlich TP 50. Die für eine erfolgreiche Totalrekonstitution erforderliche erste Konformationsänderung konnte also mit oder ohne eingebauter 5S RNS bewirkt werden.

Die zweistufig rekonstituierten Partikel III waren bei vollständigem Proteingehalt deutlich aktiv; sie ließen sich durch eine Inkubation bei 50°C und 20 mM Mg Ac mit 5S RNS zu voll aktiven R50S rekonstituieren. Die sucrosebehandelten Partikel III erforderten außerdem die Zugabe von TP 50 für die Aktivierung zu voll aktiven R50S.

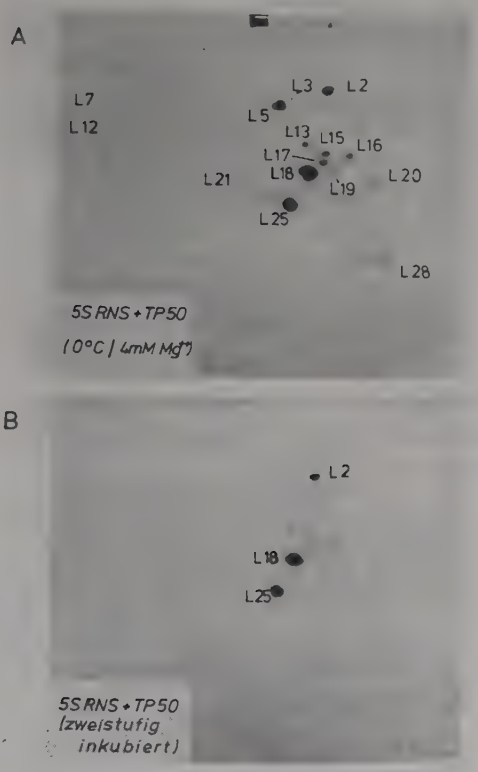
Die detaillierte Analyse der Partikel III (-5S RNS-Partikel) wird später beschrieben; dabei werden -5S RNS-Partikel und +5S RNS-Partikel(=R50S) in verschiedenen Tests auf ribosomale Partialfunktionen untersucht und die Bedeutung der 5S RNS für die einzelnen Funktionen dargestellt.

3.8. Isolierung von verschiedenen 5S RNS-Protein-Komplexen

Die Inkubation von TP 50 allein mit der 5S RNS unter den verschiedenen Bedingungen, führte zu Partikeln mit einheitlichem Sedimentationsverhalten. Ihr S-Wert betrug 7S (Abb. 27, F).

Nach Inkubation von 5S RNS mit TP50 bei 0^{o}C und 4 mM Mg Ac enthielten die erhaltenen Partikel überraschenderweise eine große Anzahl von Proteinen (Tabelle XVIII, Exp. 3; Abb. 29, A). Die vier Proteine L2, L5, L18, L25 waren in normalen Mengen und die elf Proteine L3, L7, L12, L13, L15, L16, L17, L19, L20, L21, L28 vermindert vorhanden. Weitere L-Proteine waren in Spuren sichtbar. Bei durch Inkubation bei 44^{o}C und 4 mM Mg Ac gewonnenen Partikeln konnten noch die Proteine L2, L5, L18, L25 deutlich bestimmt werden, weitere Proteine waren nicht oder nur in Spuren zu finden. Die zweistufig rekonstituierten Partikel aus 5S RNS und TP 50 besaßen schließlich nur die drei Proteine L2, L18, L25 in unverminderten Mengen (Abb. 29, B); bei einer von drei Präparationen waren nach zweistufiger Inkubation nur L18 und L25 zu identifizieren. Alle 5S RNS-Proteinkomplexe waren sowohl im Fragment-Test als auch bei der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese nicht aktiv.

Abb. 29: Proteinmuster von rekonstituierten Partikeln aus 5S RNS und Proteinen



A: 5S RNS + TP 50 (0^{o}C/4 mM Mg Ac)

B: 5S RNS + TP 50 (44^{o}C/4 mM Mg Ac ⟶ 50^{o}C/20 mM Mg Ac)

(s. auch Legende zu Tabelle XVIII).

3.9. Komponenten, die für die Konformationsänderung von $RI_{50}(1)$ nach $RI^*_{50}(1)$ während des ersten Rekonstitutionsschritts notwendig sind

Die Isolierung der Rekonstitutionszwischenprodukte erlaubte die Unterscheidung von 18 früh und 6 später an die 23S RNS bindenden Proteinen. Das $RI_{50}(1)$-Partikel, welches die 18 Proteine schon nach Inkubation bei 0^oC fest gebunden enthielt, konnte durch eine Hitzeaktivierung bei 44^oC und 4 mM Mg Ac in $RI_{50}(1)$ überführt werden. Die Bildung eines dem $RI^*_{50}(1)$ entsprechenden Partikels konnte nach Inkubation von $RI_{50}(1)$ bei 50^oC und 20 mM Mg Ac nicht beobachtet werden. 5S RNS war für die Konformationsänderung nicht notwendig, wie die Versuche mit -5S RNS-Partikeln zeigten.

In den folgenden Experimenten wurde versucht, den Kreis der bei dem Konformationswandel erforderlichen Proteine einzuschränken.

Von 1,2c, 2,0c, 4,0c LiCl-cores wurden durch Essigsäureextraktion Proteine vorbereitet und mit 23S RNS und 5S RNS im ersten Rekonstitutionsschritt 20 Min bei 44^oC und 4 mM Mg Ac inkubiert und danach im Eisbad abgekühlt. Vor der anschließenden zweiten Inkubation von 90 Min bei 50^oC und 20 mM Mg Ac wurden TP 50 oder die komplementären split-Proteine hinzugefügt.

Da die Totalrekonstitution von 50S über das Zwischenprodukt $RI^*_{50}(1)$ abläuft, konnte die Aktivität der erhaltenen Partikel zugleich als Maß für die Änderung der Konformation während des ersten Rekonstitutionsschritts verwandt werden (Tabelle XXI).

Tabelle XXI:

1. Inkubation (44°C/4mM Mg^{++})			2. Inkubation	Poly(Phe)-
23S RNS oder cores	Proteine	5S RNS	50°C/20mM Mg^{++} Proteine	Synthese cpm
23S RNS	TP 50	+		22.142
23S RNS	-	+	TP 50	2.802
4,0c	-	-	TP 50	22.307
23S RNS	4,0c HAC	+	TP 50	1.857
23S RNS	4,0c HAC+ TP 50	+	-	19.006
2,0c	-	-	TP 50	24.519
23S RNS	2,0c HAC	+	TP 50	18.173
23S RNS	2,0c HAC+ TP 50	+	-	22.309
2,0c	-	-	Sp 2,0	17.358
23S RNS	2,0c HAC	+	Sp 2,0	19.247
23S RNS	2,0c HAC+ Sp 2,0	+	-	20.213
1,2c	-	-	Sp 1,2	23.864
23S RNS	1,2c HAC	+	Sp 1,2	20.152
23S RNS	1,2c HAC+ TP 50	+	-	21.043
Kontrollen			30S	478
			30S + 50S	35.393

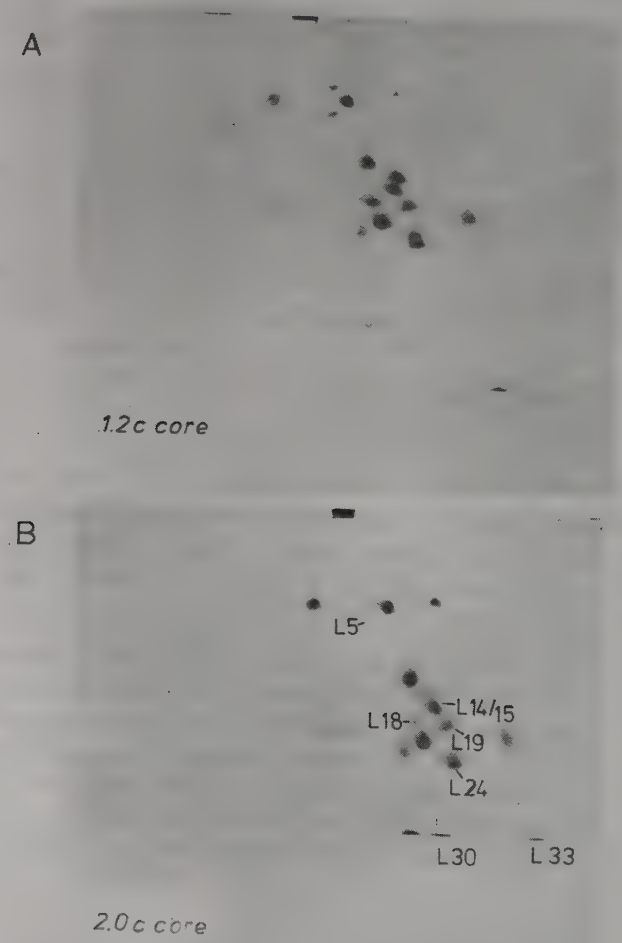
Die core-Partikel lassen sich durch die Inkubation bei 50°C und 20 mM Mg Ac mit TP 50 bzw. split-Proteinen zu aktiven 50S Untereinheiten rekonstituieren. Dagegen benötigt die Totalrekonstitution eine vorhergehende Inkubation bei 44°C und 4 mM Mg Ac.

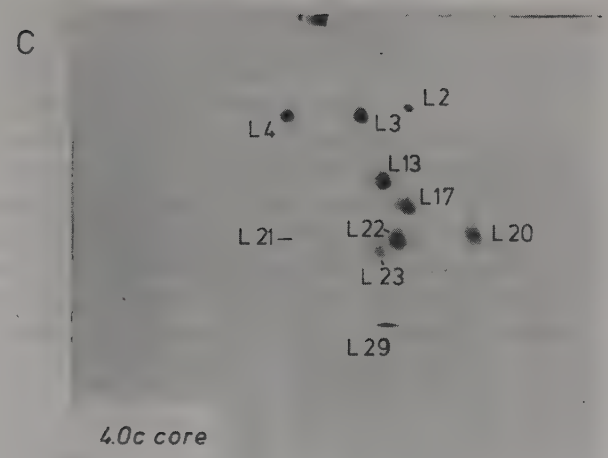
Wird die RNS im ersten Schritt mit 2,0c HAC- bzw. 1,2c HAC-Proteinen inkubiert, können nach Zugabe von TP 50 bzw. sp-Proteinen während der zweiten Inkubation aktive Partikel gewonnen werden. Der Zusatz von 4,0c HAC-Proteinen während der ersten Stufe ist nicht ausreichend, denn die Partikel zeigen nach der zweiten Inkubation mit TP 50 kaum Aktivität, im Gegensatz

zum unbehandelten 4,0c core, das mit TP 50 bei 50°C und 20 mM Mg Ac rekonstituiert werden kann.

Die Proteinmuster der core-Partikel zeigen Abb. 30, A-C.

Abb. 30: Proteingehalt von LiCl-core-Partikeln

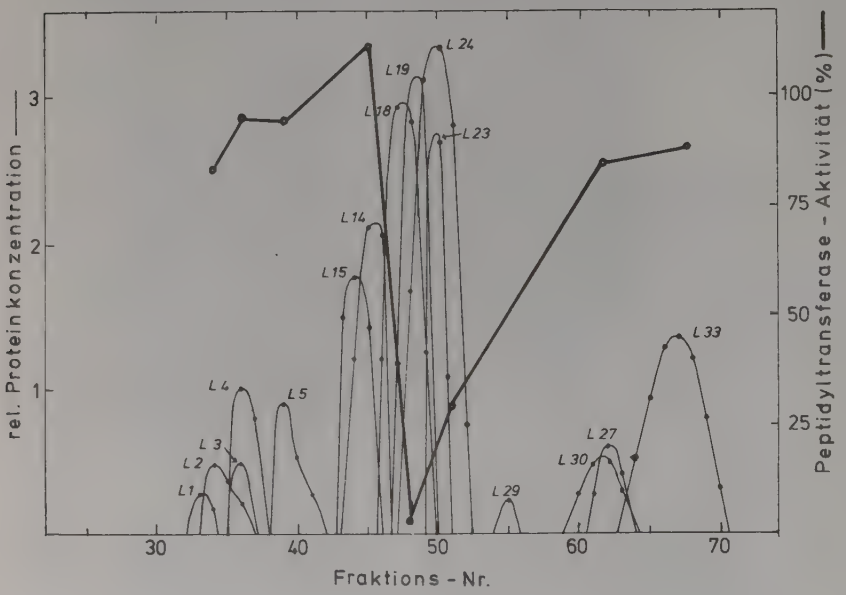




Nach 2D-Gelelektrophorese erhaltene Proteinmuster von 1,2c core- (A); 2,0c core- (B); 4,0c core-Partikeln (c). Das 4,0c core enthält die in C bezeichneten L-Proteine, zusätzlich sind auf dem 2,0c core die in B mit Pfeilen markierten Proteine vorhanden.

Die Proteine, die auf dem 2,0c core bzw. dem 1,2 c core mehr enthalten sind als auf dem 4,0c core, sind offensichtlich während des ersten Rekonstitutionsschritts von Bedeutung.
Um die notwendigen Proteine zu identifizieren, wurden 20.000 A_{260}-Einheiten 1,2 c cores in 4 M LiCl inkubiert und die split-Proteine sp 1,2-4,0 auf einer Sephadex-G 100 Säule getrennt (Abb. 31).

Abb. 31: Sephadex- G 100 Gelfiltration der sp 1,2-4,0 Proteinfraktion



Bevor die split-Proteine auf die Säule aufgetragen wurden, waren RNS-Reste durch Essigsäureextraktion und die sauren Proteine durch DEAE-Cellulose Chromatographie entfernt worden. Nach der Gelfiltration (s. Methoden) wurde das Eluat fraktioniert. Eine Probe jeder Fraktion wurde in der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophorese untersucht. Die Gele wurden mit Amidoschwarz angefärbt und nach der Entfernung von ungebundenem Farbstoff mit einem Joyce-Loebl-Densitometer ausgewertet. Aus diesen Kurven konnten die

relativen Konzentrationen der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine bestimmt werden (• ——— •).

Ein Aliquot der Summe der Fraktionen (34, 36, 39, 45, 48, 51, 61, 67) wurde bei Auslassung von jeweils einer Fraktion mit 23S RNS, 5S RNS und 4,0c HAC-Proteinen im ersten Rekonstitutionsschritt (44°C/4 mM Mg^{++}) inkubiert. Vor der zweiten Inkubation bei 50°C und 20 mM Mg Ac wurden TP 50 zugegeben und anschließend die Aktivität der Partikel im Fragment-Test untersucht. Die Aktivitäten der (-1 Fraktion)-Ansätze wurden in % der Aktivität des Rekonstitutionsansatzes mit der Summe der Fraktionen aufgetragen (o——o).

Wenn 23S RNS im ersten Schritt nur mit 4,0c HAC-Proteinen inkubiert wurde und die TP 50 Fraktion im zweiten Rekonstitutionsschritt hinzugefügt wurde, waren die Partikel im Fragment-Test nicht aktiv. Bei Inkubation der 23S RNS mit 4,0c HAC-Proteinen und der sp 1,2-4,0 Proteinfraktion in der ersten Stufe und Zugabe von TP 50 erst vor der zweiten Inkubation, erreichten die Partikel volle Peptidyltransferaseaktivität. Die für diese Stimulierung erforderlichen Proteine aus der sp 1,2-4,0 Fraktion konnten durch folgenden Versuchsansatz erkannt werden: 23S RNS wurde mit 4,0c HAC-Proteinen und einem Aliquot der Summe der nach Gelfiltration (Abb. 31) erhaltenen Fraktionen 34, 36, 39, 45, 48, 51, 61 und 67 bei 44°C und 4 mM Mg Ac inkubiert. Außerdem wurde während dieser ersten Inkubation jeweils eine der acht Fraktionen ausgelassen. Vor der zweiten Inkubation bei 50°C und 20 mM Mg Ac wurde jeweils TP 50 hinzugegeben. Anschließend wurde die Aktivität im Fragment-Test untersucht.

Volle Aktivität zeigten die Partikel, wenn im ersten Schritt 23S RNS mit 4,0c HAC-Proteinen und der Summe der Fraktionen inkubiert worden war (100 % Aktivität in Abb. 31). Wenn eine der Fraktionen 34, 36, 39, 45, 61 oder 67 während der ersten Inkubation nicht eingesetzt war, blieb die Peptidyltransferaseaktivität kaum beeinflußt. Die in diesen Fraktionen enthaltenen Proteine (einschließlich L5, L14/15, L30 und L33) waren im ersten Rekonstitutionsschritt nicht von Bedeutung. Nur die die Proteine L18, L19, L23 und L24 enthaltenen Fraktionen 48 und 51 durften während der ersten Inkubation nicht ausgelassen werden. Bei ihrem Fehlen war die Aktivität der Rekonstitutionspartikel stark vermindert (3 % bzw. 28 % Aktivität; s. Abb. 31).

Die nach der Methode von Hindennach et al (1971) rein isolierten Proteine L18, L19, L23 und L24 wurden einzeln und in Kombinationen auf ihren Stimulierungseffekt geprüft (Tabelle XXII).

Tabelle XXII: Identifizierung von im ersten Rekonstitutionsschritt notwendigen Proteinen

1. Inkubation				2. Inkubation		Peptidyltransferaseaktivität cpm
RNS 23S	RNS 5S	4,0c HAC	Proteine	5S RNS	Proteine	
+	+	-	-	-	TP 50	813
+	+	+	-	-	TP 50	588
+	+	+	L18	-	TP 50	522
+	+	+	L19	-	TP 50	515
+	+	+	L23	-	TP 50	631
+	+	+	L24	-	TP 50	6.257
+	+	+	L24 L18	-	TP 50	5.940
+	+	+	L24 L19	-	TP 50	7.533
+	+	+	L24 L23	-	TP 50	4.633
+	+	+	L18 L19 L23	-	TP 50	789
+	+	+	L24 L18 L19 L23	-	TP 50	6.338
+	+	-	L24 L18 L19 L23	-	TP 50	675
+	+	-	L24 L19	-	TP 50	701
+	+	-	TP 50	-	-	7.024
+	+	+	L24	-	TP 50	6.553
+	-	+	L24	+	TP 50	6.298
Kontrollen					-	435
					50S	15.440

Im ersten Schritt sind 23S und 5S RNS mit 4,0c HAC-Proteinen und/oder den Einzelproteinen bei 44°C und 4 mM Mg Ac für 20 Min inkubiert worden. Vor der anschließenden zweiten Inkubation (50°C/20 mM Mg Ac) wurde TP 50 zugesetzt sowie, wenn 5S RNS nicht von Anfang an enthalten war, auch 5S RNS. Zur Kontrolle wurden TP 50 schon in der ersten Stufe zugefügt bzw. die 23S und 5S RNS ohne Proteine im ersten Schritt inkubiert.

Wenn die RNS im ersten Schritt nur mit 4,0c HAC-Proteinen inkubiert wurde, blieben die Partikel trotz Proteinzugabe in der zweiten Stufe inaktiv. Die Zugabe von L18 oder L19 oder L23 bzw. allen drei Proteinen zusammen, zeigte keinen Effekt, allein Protein L24 konnte Peptidyltransferaseaktivität induzieren. Zusätzliche Zugabe von L19 verbesserte den Einfluß, im Gegensatz zu L18 und L23, die sowohl allein als auch zusammen mit L19 die Wirkung von L24 nicht stimulierten.

5S RNS konnte vor der ersten oder der zweiten Inkubation zugefügt werden, was veranschaulicht, daß der von den 4,0c HAC-Proteinen und L24 im ersten Schritt bewirkte Effekt unabhängig von 5S RNS ist.

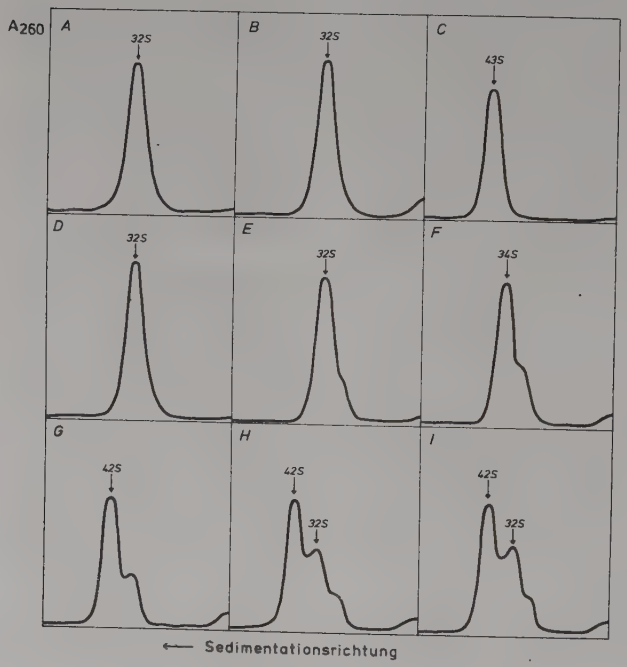
Wie vermutet, setzt die Peptidyltransferaseaktivität eine Konformationsänderung im ersten Rekonstitutionsschritt voraus (Abb. 32), die von Protein L24 bei Vorhandensein der 4,0c HAC-Proteine bewirkt wird (Abb. 32, I). Die 23S RNS sedimentiert bei Rekonstitutionspufferbedingungen mit einem S-Wert von 32S (Abb. 32, A). Ihre Konformation wird durch eine Inkubation ohne Proteine (Abb. 32, D), mit L19 und L24 (Abb. 32, E) und mit 4,0c HAC-Proteinen ohne L24 (Abb. 32, F) kaum beeinflußt.

Der hier beobachtete Konformationswandel entspricht der Bildung von Partikel II (Abb. 32, G) und der Bildung von $RI^*_{50}(1)$ aus $RI_{50}(1)$, was aus den Aktivitätsmessungen und dem nahezu identischen Sedimentationsverhalten ($RI^*_{50}(1)$: 41S; Abb. 32, G bzw. I: 42S) gefolgert werden kann. Das 4,0c core hat offensichtlich auch ohne L24 eine vergleichbare Konformation, sein S-Wert beträgt 43S (Abb. 32, C). Hieraus

läßt sich erklären, daß das 4,0c core unter den Bedingungen der partiellen Rekonstitution, die dem zweiten Schritt der Totalrekonstitution entspricht, mit Proteinen aktivierbar ist und der Inkubation bei 44°C und 4 mM Mg Ac nicht bedarf.

Die Inkubation von 23S RNS mit den Proteinen L19 und L24 allein ohne 4,0c HAC in der ersten Stufe stimulierte die Aktivität nicht. Außer L24 und L19 waren also auch mindestens einige der 4,0c HAC-Proteine bei der Konformationsänderung von Bedeutung. Die detaillierte Aufschlüsselung der für diesen Effekt minimal benötigten Proteine bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Abb. 32: Identifizierung von für die Konformationsänderung im ersten Rekonstitutionsschritt benötigten Proteinen



Absorptionsprofile von mit und ohne Inkubation (20 Min/ 44°C; 4 mM Mg^{++}) im ersten Schritt erhaltenen Partikeln nach Zuckergradientenzentrifugation (4-20 % Sucrose in Rekonstitutionspuffer (4 mM Mg Ac); 5 Std/160000 g):

A: 23S RNS allein 0°C
B: 23S RNS + 4,0c HAC-Proteine + L19 + L24 0°C
C: 4,0c core-Partikel 0°C
D: 23S RNS allein 44°C
E: 23S RNS + L19 + L24 44°C
F: 23S RNS + 4,0c HAC-Proteine 44°C
G: 23S RNS + TP 50 44°C
H: 23S RNS + 4,0c HAC-Proteine + L19 + L24
I: 23S RNS + 4,0c HAC-Proteine + L24 .

3.10. Vergleichende Untersuchungen von zweistufig rekonstituierten Partikeln aus 23S RNS und TP 50 mit und ohne 5S RNS

Die totalrekonstituierten R50S zeigten in den Poly (Phe)-Synthesetests 60-100 % Aktivität im Vergleich zu nativen Untereinheiten. Partikel, die nur aus 23S RNS und Proteinen bestanden, erreichten bei diesem Ansatz 10-20 % der Aktivität der (+ 5S RNS)-Partikel. Der Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthesetest erlaubt aber nur eine summarische Aussage über die Translationsfähigkeit der Partikel.

Um die spezifischen Aktivitäten der rekonstituierten Partikel in den verschiedenen ribosomalen Teilfunktionen zu untersuchen, wurden in größeren Ansätzen (- 5S RNS)-Partikel(= Partikel III) und (+ 5S RNS)-Partikel (= R50S) hergestellt und einer umfangreichen

Funktionsanalyse unterzogen. Auf diese Weise kann die Bedeutung der kleinen ribosomalen 5S RNS für die einzelnen Partialfunktionen abgeleitet werden.

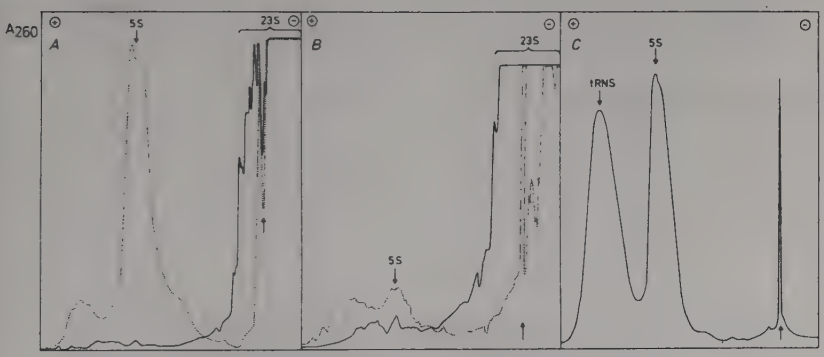
600 A_{260}-Einheiten 23S RNS wurden mit 800 Äquivalenzeinheiten TP 50 mit und ohne 25 A_{260}-Einheiten 5S RNS zweistufig rekonstituiert. Unlösliche Produkte wurden durch Zentrifugation nach der Inkubation entfernt (10 Min/30.000 g). Die Partikel wurden durch Ultrazentrifugation (16 Std/100.000 g) sedimentiert und in TMNSH-Puffer resuspendiert (200 A_{260}-Einheiten/ml).

3.10.1. Bestimmung des 5S RNS-Gehalts

Der 5S RNS-Gehalt der (-5S RNS)-Partikel wurde mittels 1D-Gelelektrophorese untersucht.

Abb. 33, A zeigt, daß die (-5S RNS)-Partikel keine oder nur einen kleinen Bruchteil der 5S RNS von (+5S RNS)-Partikeln enthalten. Aus Abb. 33, B läßt sich der 5S RNS-Gehalt der (-5S RNS)-Partikel auf <1 % der R50S abschätzen: 0,24 A_{260}-Einheiten Gesamt-RNS der R50S haben noch weit mehr als doppelt soviel 5S RNS wie 16 A_{260}-Einheiten RNS der (-5S RNS)-Partikel. Zur Kontrolle wurden die Positionen von isolierter 5S RNS und von t-RNS (4S RNS) bestimmt (Abb. 33, C).

Abb. 33: Bestimmung des 5S RNS-Gehalts der (-5S RNS)-Partikel



Die RNS von (-5S RNS)-Partikeln und R50S wurde mit Phenol extrahiert und in einer 1D-Gelelektrophorese untersucht. In Abb. 33, A-C sind die Absorptionsprofile mit einem Gelscan-Spectrophotometer aufgezeichnet (s. Methoden, 2.9.1.b).

A: Jeweils 16 A_{260}-Einheiten RNS von (+ bzw. -5S RNS)-Partikeln (····· ; ———)

B: 16 A_{260}-Einheiten RNS von (-5S RNS)-Partikeln im Vergleich zu 0,24 A_{260}-Einheiten RNS von R50S (Vergrößerungsfaktor gegenüber A = 4) (——— ; ·····)

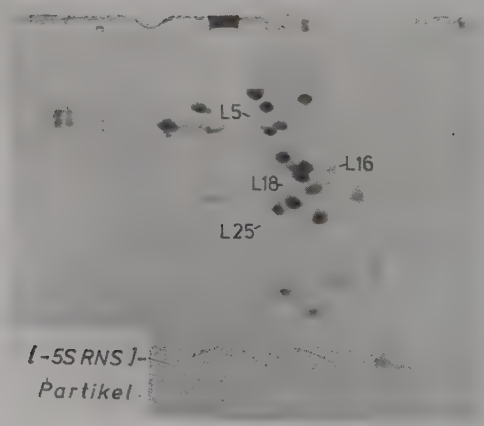
C: Jeweils 0,5 A_{260}-Einheiten t-RNS bzw. isolierte 5S RNS

Die Pfeile markieren die Grenze zwischen 5- und 10 %igem Gel.

3.10.2. Proteingehalt der (-5S RNS)-Partikel

Das Proteinmuster der (-5S RNS)-Partikel ist dem der unter 3.7.4. beschriebenen Partikel III vergleichbar, welche nach Zentrifugation durch Sucrose gewonnen wurden (Abb. 34). Die Partikel enthalten fast alle ribosomalen Proteine. Die Proteine L5, L18 und L25 sind nur in Spuren, L16 ist vermindert vorhanden.

Abb. 34: Proteinmuster der (-5S RNS)-Partikel



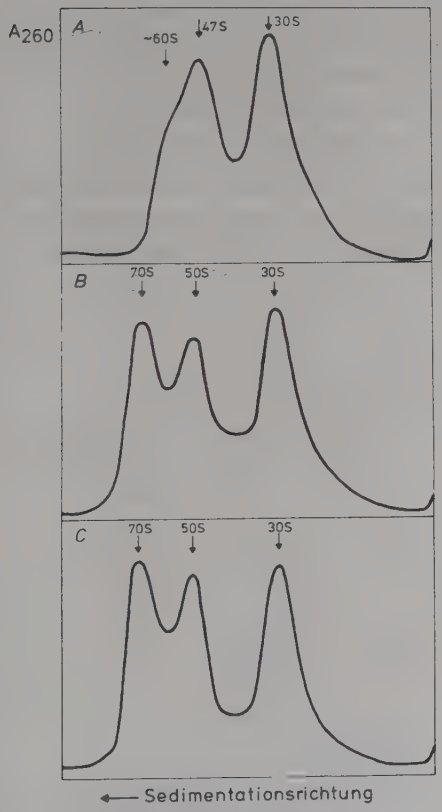
Alle ribosomalen Proteine sind zu erkennen. Die Proteine L5, L18, L25 sind nur in Spuren, L16 ist vermindert vorhanden.

3.10.3. Funktionelle Untersuchungen

3.10.3.1. Assoziation mit 30S Untereinheiten

Das Assoziationsverhalten der Partikel mit 30S Untereinheiten unter nichtenzymatischen Bedingungen bei 10 mM Mg^{++} wurde im Vergleich zu nativen 50S getestet (Abb. 35).

Abb. 35: Assoziation der rekonstituierten Partikel mit 30S Untereinheiten



Jeweils 1,5 A_{260}-Einheiten 30S wurden mit 1,5 A_{260}-Einheiten (-5S RNS)-Partikel (A), R50S (B) und 50S (C) vermischt und im Zuckergradienten (10-30 % Sucrose in TMNSH) analysiert (s. Methoden 2.10.1.). Die Positionen von 30S, 50S und 70S sind mit Pfeilen markiert.

Die R50S Partikel verhalten sich wie native Untereinheiten und bilden mit 30S bei 10 mM Mg^{++} 70S Ribosomen (B-C). Die (-5S RNS)-Partikel zeigen nur geringe Assoziation mit 30S, wobei das Produkt nicht wie 70S sedimentiert, sondern mit einem S-Wert von etwa 60S. Die Assoziationsfähigkeit der ribosomalen Untereinheiten wird durch das Fehlen von 5S RNS und den drei Proteinen L5, L18, L25 sehr vermindert.

Die rekonstituierten Partikel wurden auf verschiedene ribosomale Partialfunktionen untersucht; die Ergebnisse sind in Tabelle XXIII zusammengefaßt.

Tabelle XXIII: Aktivitäten von (-5S RNS)- und R50S-Partikeln in ribosomalen Funktionen

Art des Funktionstests		Kontrollen Leerwerte cpm		native 50S = 100 % cpm	R50S % im Vergleich zu 50S	(-5S RNS)-Partikel % von 50S	% von R50S
TRANSLATION	R17 abhängige mit S150 Proteinsynthese	30S+50S -IF 753	30S allein + IF 179	10.154	79,5	23,4	29,4
	mit S150DEAE	-IF 84	+ IF 81	4.413	56,1	7,1	12,7
	Poly(U)-abhängige mit S150		30S allein 157	20.891	97,9	20,5	20,9
	Poly(Phe)-Synthese mit S150 DEAE		30S allein 107	718	95,5	18,6	18,2
	nichtenzymatische Translation (NET)	OMinWert (-5S RNS) Partikel 127 R50S 137 50S 149		3.279	89	2,6	2,9
tRNS BINDUNG	EF-T abhängige Phe-t-RNS Bindung	30S+50S -EF-T 1088	30S allein +EF-T 2405	15.526	91,2	4,7	4,3
	IF-abhängige Ac-Phe-t-RNS Bindung	30S+50S -IF 1374	30S allein +IF 2522	8.796	88,4	23,8	26,9
	im Filterversuch nach Nirenberg & Leder (1964)	30S+50S -Poly(U) 844	30S allein +Poly(U) 1090	5.176	75,5	7,9	10,5
	im RNase Ansatz nach Pestka (1969)	30S+50S -Poly(U) 387	30S allein + Poly(U) 256	4.258	74,3	17,4	23,5
	unter Alkoholbed. Leucyl-t-RNS-Bindung		ohne Partikel 3120	17.798	94,5	86,2	91,2
	Ac-Leucyl-t-RNS Bindung		ohne Partikel 4294	18.508	91,9	74,3	80,5
PEPTIDYLTRANSF. Puromycin Reaktion mit	IF-abhängig gebundener Ac-Phe-t-RNS	30S+50S -IF 3155	30S allein +IF 1310	26.226	79,6	8,0	10,0
	Ac-Leucyl-t-RNS		ohne Partikel 643	9.387	96,2	13,7	14,2
	Fragment CACCA-Leu-Ac		ohne Partikel 307	25.571	83,1	10,0	12,0
	Chloramphenicol		ohne Partikel 61	994	48,5	2,4	4,9
	Fragment CACCA-Leu-Ac		ohne Partikel 11 +CAM 24	738 +Chloramphenicol (CAM) 1.512	123 +CAM129	0 +CAM 13,0	0 +CAM10,5
	EF-G abhängige GTPase Reaktion	30S+50S -EF-G 1.361	30S allein +EFG 1174	21.983	102	82,1	80,4

Die (-5S RNS)-Partikel und R50S wurden im Vergleich zu nativen 50S Untereinheiten in verschiedenen Tests auf ribosomale Funktionen untersucht. Die Versuchsansätze sind unter Methoden beschrieben (s. 2.10.). Als Kontrollen wurden außerdem die Aktivitäten von 30S allein bestimmt, bzw. bei Unabhängigkeit des Ansatzes von 30S wurde kein Partikel eingesetzt. In der ersten Spalte ist jeweils die Spezifität des Funktionstests gekennzeichnet. Die Aktivitäten der rekonstituierten Partikel sind in von Hundert der nativen 50S bzw. bei (-5S RNS)-Partikeln auch in % der R50S angegeben. Vor der Aktivitätsberechnung ist die Leerwertaktivität subtrahiert worden.

3.10.3.2. Translationsfähigkeit

Die rekonstituierten R50S Partikel erreichten in den Proteinbiosynthesetests mit natürlicher m-RNS (R 17-System) und synthetischer m-RNS (Poly(U)-Ansatz) vergleichbare Aktivitäten wie native 50S Untereinheiten. Im Vergleich dazu zeigten (-5S RNS)-Partikel stark reduzierte Aktivitäten, die sich jedoch als signifikant (7-20 %) erwiesen.

Im Test auf nichtenzymatische Poly(Phe)-Synthese (NET-System) waren (-5S RNS)-Partikel nicht aktiv (2,6 %) im Gegensatz zu R50S (89 %).

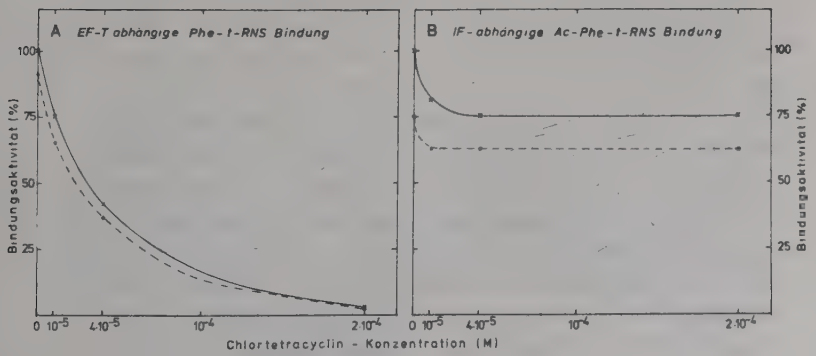
3.10.3.3. t-RNS Bindung

Die Fähigkeit der Partikel, t-RNS zu binden, wurde detaillierter untersucht, da vermutet wird, daß die 5S RNS bei der t-RNS-Bindung direkt über Wasserstoffbrückenbindungen mit der TΨCG-Schleife der t-RNS in Wechselwirkung tritt (Forget & Weißmann, 1967; Jordan, 1971).

Die Bindungstests unter enzymatischen Bedingungen erbrachten unterschiedliche Ergebnisse. Die (-5S RNS)-Partikel zeigten bei der EF-T abhängigen Phe-t-RNS Bindung eine besonders hohe Aktivitätseinbuße (nur 4-5 % Aktivität im Vergleich zu nativen 50S und R50S). Im Gegensatz dazu konnten sie mit Inititationsfaktoren Ac-Phe-t-RNS deutlich binden (25-30 %).

Dies läßt sich dadurch erklären, daß die Aminoacyl-t-RNS (Phe-t-RNS), die mit EF-T an das Ribosom bindet, an einen anderen Bindungsort (A-site) haftet als die Ac-Phe-t-RNS, die ein Analog einer Peptidyl-t-RNS darstellt und mit Initiationsfaktoren in die ribosomale P-site bindet. Der qualitative Unterschied der Bindungsarten wurde durch Chlortetracylin-Hemmkurven nachgewiesen (Abb. 36).

Abb. 36: EF-T abhängige Phe-t-RNS und IF-abhängige Ac-Phe-t-RNS Bindung



Die EF-T abhängige (^{14}C)-Phe-t-RNS Bindung (A) wurde im Ansatz nach Ballesta (1974) und die IF abhängige Ac-(^{14}C)-Phe-t-RNS Bindung (B) nach Zagorska et al (1971) getestet. Die Bindungsaktivitäten sind in von Hundert der t-RNS Bindung an native 50S Untereinheiten ohne Chlortetracyclinzugabe zum Bindungsansatz angegeben (50S: X ——— X; R50S: • --- •).

Chlortetracyclin hemmt die Bindung der Phe-t-RNS in die Aminoacyl-site schon bei geringen Konzentrationen fast vollständig ($4 \cdot 10^{-5}$ M TET: 30 %; $2 \cdot 10^{-4}$ M TET: 0 % Aktivität). Die enzymatische Bindung der Peptidyl-t-RNS wurde bei geringen Konzentrationen von Chlortetracyclin kaum beeinflußt ($2 \cdot 10^{-4}$ M TET: 75 % Aktivität).

Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, daß 5S RNS für die enzymatische Bindung der t-RNS in die Aminoacyl-site des Ribosoms notwendig ist, wohingegen Peptidyl-t-RNS trotz Fehlens von 5S RNS in die ribosomale P-site enzymatisch binden kann.

Unter nichtenzymatischen Bedingungen bei 12 mM Mg Ac konnten die (-5S RNS)-Partikel Phe-t-RNS, obwohl vermindert, binden, was im RNase Ansatz (nach Pestka, 1969) verdeutlicht wurde. Bei diesem Versuch wird die t-RNS, die an 30S allein gebunden hat, durch Ribonuclease A zerstört. Die 50S Untereinheit schützt den t-RNS-Ribosomkomplex; diesen Effekt können auch die (-5S RNS)-Partikel ausüben (23,5 % Aktivität von nativen 50S). Dieser Befund kann die Polypeptidsynthesefähigkeit der (-5S RNS)-Partikel (20 % der Aktivität von R50S) bei höheren Mg^{++}-Konzentrationen (8 mM Mg^{++} im R17-Ansatz, 12 mM Mg^{++} im Poly(U)-Test) erklären. Im Bindungstest unter Alkoholbedingungen zeigten die (-5S RNS)-Partikel volle t-RNS Bindungsaktivität ($\sim$80 %), die u.U. auf die Entfaltung des Ribosoms in 33 % Äthanol (Voigt & Parmeggiani, 1973) und die Freilegung von unspezifischen t-RNS Bindungsstellen zurückzuführen ist.

3.10.3.4. Peptidyltransferase

Die Peptidyltransferase-Aktivität wurde mittels Puromycin-Reaktion von enzymatisch gebundener Ac-Phe-t-RNS und unter Alkoholbedingungen von Ac-Leucyl-t-RNS und Fragment CACCA-Leu-Ac geprüft.

Unter den verschiedenen Bedingungen erreichten (-5S RNS)-Partikel jeweils etwa 10 % der Aktivitäten von R50S und nativen 50S, die vergleichbar aktiv waren.

Mit EF-T enzymatisch gebundene Phe-t-RNS reagierte nicht mit Puromycin.

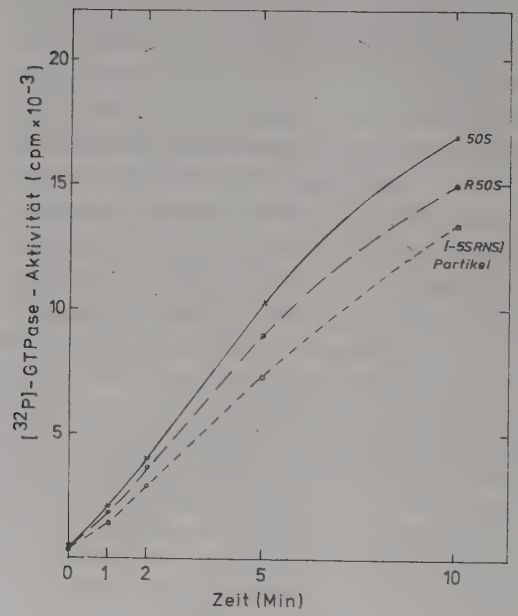
Mit der Gleichgewichtsdialyse wurde die Bindung von Chloramphenicol und dem Fragment CACCA-Leu-Ac an die Partikel bestimmt. Chloramphenicol bindet in die A-site des Peptidyltransferasezentrums (Dietrich et al, 1974) und das Fragment spezifisch in seine P-site (Nierhaus& Nierhaus, 1973).Die unterschiedlichen Bindungsstellen von Chloramphenicol und dem Fragment werden auch dadurch deutlich, daß die Zugabe von Chloramphenicol bei der Fragmentbindung die Bindungsaktivität der drei Partikel erhöht. Die (-5S RNS)-Partikel waren in beiden Bindungstests nicht oder nur gering aktiv ($\leq$ 10 %), was vermuten läßt, daß durch das Fehlen von 5S RNS die Konformation des Peptidyltransferasezentrums stark betroffen ist.

3.10.3.5. EF-G abhängige GTP-Spaltung

Die (-5S RNS)-Partikel erreichten bei der EF-G abhängigen GTPase Reaktion volle Aktivität (80 % im Vergleich zu R50S und nativen 50S). Die Kinetikstudie der

GTP-Spaltung veranschaulicht, daß die (-5S RNS)-Partikel den R50S und nativen 50S nur wenig nachstehen (Abb. 37).

Abb. 37: Kinetiken der EF-G abhängigen GTP-Spaltung



Im Reaktionsansatz nach Parmeggiani et al (1971) wurde bei 37°C inkubiert und zu den angegebenen Zeiten ein Aliquot entnommen und dessen Aktivität bestimmt.

4. Diskussion

4.1. Partielle Rekonstitution

Die partielle Rekonstitution von Cs Cl-cores und von Li Cl-cores der 50S Untereinheiten, die die Mehrzahl der ribosomalen Proteine und 5S RNS enthielten, ist beschrieben worden (Staehelin, Maglott & Monro, 1969; Nierhaus & Montejo, 1973). Unter diesen Inkubationsbedingungen konnten z.B. 4,0c cores, die weniger als ein Drittel der 50S-Proteine enthalten, zu aktiven Partikeln rekonstituiert werden (Tabelle II). Das 4,0c core enthielt keine 5S RNS, d.h. der Einbau der 5S RNS ist keine kritische Stufe während der Rekonstitution der E.coli 50S-Untereinheit, was von Marcot-Queiroz und Monier (1967) diskutiert worden war.

4.2. Einstufige Totalrekonstitution

Die Totalrekonstitution aus 23S RNS, 5S RNS und TP 50 unter den gleichen Bedingungen führte zu Partikeln mit deutlicher Aktivität im Poly(Phe)-Syntheseansatz bei ungesättigter (Phe)-Konzentration; sie waren jedoch im Fragmenttest inaktiv.

Dieses einstufige Verfahren, sogenannt, weil die Bedingungen während der Inkubation konstant gehalten wurden, ist bei der Totalrekonstitution zunächst beibehalten worden. Eine Optimierung der Mg Ac- und NH_4Cl-Konzentrationen während der 90minütigen Inkubation bei 50^oC ergab Werte von 8 bzw. 400 mM; dennoch

konnte die Aktivität der rekonstituierten Partikel nicht über 10 % im Vergleich zu 50S Untereinheiten gesteigert werden. Die Beteiligung der 30S Untereinheit bei dem in vivo (Nomura, 1973; Kreider & Brownstein, 1971) und in vitro (Maruta et al, 1971) Aufbau von 50S ist diskutiert worden. Hosokawa et al (1973) beschrieben einen Einfluß von Polyaminen bei der Bildung der 50S Untereinheit. Weder die Zugabe von 30S Untereinheiten und TP 30 noch von Polyaminen konnte die Aktivität von einstufig rekonstituierten Partikeln verbessern. Auch der Zusatz von energiereichen Verbindungen wie ATP, GTP und PEP sowie S150 Oberstandsenzymen hatte keine stimulierende Wirkung.

Die Zerstörung der 23S RNS während der einstufigen Inkubation konnte die Inaktivität der rekonstituierten Partikel erklären. Darum wurde versucht, die Aktivität durch Zugabe von Ribonucleasehemmern zum Rekonstitutionsansatz zu erhöhen. Sowohl Zink- und Quecksilberchlorid als auch SDS hatten keine fördernde Wirkung; sie verminderten die Ausbeute sogar. Den gleichen Effekt zeigten Äthanol und Methanol, obwohl sie RNasen inhibieren (Ceri & Maeba, 1973) und die Rekonstitution zu aktiven Partikeln fördern sollten (Hernandez et al, 1975).

4.3. Zweistufige Totalrekonstitution

Da das 4,0c core unter konstanten Bedingungen rekonstituierbar war, wurde versucht, zunächst durch Inkubation von 23S RNS, 5S RNS und 4,0c HAC-Proteinen das 4,0c core wiederherzustellen und dann mit den sp 4,0-Proteinen zu 50S zu gelangen:

23S RNS ⟶ 4,0c core ⟶ 50S;

auch dieses Verfahren blieb erfolglos.

Mittels einer zweistufigen Inkubation, bei der die Temperatur und die Mg^{++}-Konzentration geändert wurden, konnten schließlich aktive 50S Partikel rekonstituiert werden.

Als Bedingungen für den ersten Schritt wurden durch die Interpolation einer Mg^{++}/Temperaturoptimierung für eine erste hypothetische Rekonstitutionsstufe 4 mM Mg Ac und 40°C bestimmt. Die erforderliche erste Inkubationsdauer betrug 20 Min. Die Optimierung des zweiten Rekonstitutionsschritts führte zu den gleichen Bedingungen wie bei der partiellen Rekonstitution (90 Min/50°C bei 20 mM Mg Ac). Die Rekonstitution war in dem pH-Bereich von 6,9-7,65 möglich, und die beste NH_4Cl-Konzentration betrug in beiden Stufen 400 mM. Mit dieser zweistufigen Inkubation konnten Partikel rekonstituiert werden, deren Struktur- und Funktionseigenschaften mit nativen 50S Untereinheiten vergleichbar waren. Sie sedimentierten mit einem S-Wert von 50S, zeigten das gleiche Proteinmuster wie die Untereinheiten und enthielten kaum zerstörte 23S RNS. In verschiedenen Funktionstests erreichten die Partikel rund 50 % der Aktivitäten von nativen 50S Untereinheiten.

Die Änderung von Temperatur und Mg^{++}-Konzentration während der Inkubation war erforderlich. Eine detaillierte Analyse der Bedingungen während der ersten Stufe führte schließlich zu einem Temperaturoptimum von 44°C, wodurch die Aktivität der Partikel noch um etwa 30 % gesteigert werden konnte.

Die ribosomalen 50S Untereinheiten anderer E.coli Stämme als A19 waren mittels der zweistufigen Inkubation rekonstituierbar. Bei dem RNase I^+-Stamm EA2 mußte jedoch die RNase zuvor durch zehnmaliges Waschen in 1 M NH_4Cl oder einmaliges Waschen in 0,6 M LiCl von den Untereinheiten entfernt werden. Die

kreuzweisen Kombinationen von RNS und Proteinen der verschiedenen E.coli Stämme ergaben ebenfalls aktive Partikel.

Überraschenderweise war die Rekonstitution abhängig von dem Erntepunkt der Bakterien, aus denen ribosomale RNS und Proteine gewonnen wurden. Wenn die Zellen während der semilogarithmischen Wachstumsphase geerntet wurden, konnten die gewonnenen 50S-Komponenten nur zu Partikeln mit geringer Aktivität rekonstituiert werden (rund 25 % Aktivität im Vergleich zu nativen 50S).

Die TP 50-Präparation war für diese geringe Ausbeute verantwortlich. Wenn die Untereinheiten vor der Proteinvorbereitung in 0,6 M LiCl gewaschen waren, zeigten die TP $50_{0,6}$ der in semilogarithmischer Phase geernteten Zellen volle Rekonstituierbarkeit. Offensichtlich haftet während dieser Phase eine RNase an den Ribosomen, sogar bei dem RNase I^- Stamm A19.

Die Aktivitäten der zweistufig rekonstituierten E.coli 50S Ribosomen liegen höher als nach der für die Totalrekonstitution der Untereinheiten von B.stearothermophilus beschriebenen Methode (Nomura & Erdmann, 1970). Das zweistufige Verfahren erwies sich auch bei der Rekonstitution der Ribosomen des thermophilen Bacillus als vorteilhaft. Bei dem Vergleich der Aktivitäten nach einstufiger Rekonstitution (20 mM $Mg^{++}/60^oC$) mit denen nach zweistufiger Inkubation (4 mM $Mg^{++}/44^oC \longrightarrow$ 20 mM $Mg^{++}/60^oC$) zeigten die letzteren Partikel deutlich höhere Aktivitäten. E.coli 50S Ribosomen ließen sich bei 60^oC nicht rekonstituieren. Die 50S Hybride aus RNS und TP 50 der beiden Bakterien waren sehr gering, jedoch signifikant aktiv, wie aus dem Poly(Phe)-Synthesetest bei ungesättigtem Aminosäureangebot zu ersehen ist (Tabelle XVI).

4.4. *In vitro* Aufbau der 50S Untereinheit

Die Auswertung der Kinetik des ersten Inkubationsschritts zeigte, daß die in vitro Bildung der 50S Untereinheit über definierte Rekonstitutionszwischenprodukte verläuft (Abb. 24-26):

$$23S\ RNS + 5S\ RNS + Proteine \xrightarrow{0^{\circ}C/4\ mM\ Mg\ Ac} RI_{50}(1)$$

$$RI_{50}(1) \xrightarrow{44^{\circ}C/4\ mM\ Mg\ Ac} RI^{*}_{50}(1)$$

$$RI^{*}_{50}(1) + Proteine \xrightarrow[\text{oder } 50^{\circ}C/20mM\ Mg\ Ac]{44^{\circ}C/4\ mM\ Mg\ Ac} RI_{50}(2)$$

$$RI_{50}(2) \xrightarrow{50^{\circ}C/20mM\ Mg\ Ac} \text{rekonstituierte 50S (R50S).}$$

Unter der Annahme, daß die schwach gebundenen Proteine, die durch Ultrazentrifugation von $RI_{50}(1)$ abgetrennt werden, bei der 50S Bildung später eingebaut werden als die fest im $RI_{50}(1)$ gebundenen Proteine, kann der Ablauf bei der 50S Rekonstitution wie folgt beschrieben werden:

RNS (23S + 5S) + 18 Proteine (L1, L2, L3, L5, L8/9, L10, L11, L13, L17, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L29 und L33)

$$\longrightarrow RI_{50}(1) \xrightarrow{\text{Konformations-änderung}} RI^{*}_{50}(1)$$

+ 8 Proteine (L6, L15, L16, L25, L27, L28, L30 und L32)

$$\xrightarrow{\text{Konformations-änderung}} RI_{50}(2) \xrightarrow{\text{Konformations-änderung}} R50S.$$

6 Proteine konnten keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden.

Für die Konformationsänderungen von $RI_{50}(1) \longrightarrow RI^{*}_{50}(1)$ und von $RI_{50}(2) \longrightarrow$ R50S sind Hitzeaktivierungen erforderlich ($44^{\circ}C/4$ mM Mg^{++} bzw. $50^{\circ}C/20$ mM Mg^{++}).

Die Bildung von $RI_{50}(2)$ aus $RI^{*}_{50}(1)$ benötigt ebenfalls eine Inkubation, die jedoch sowohl bei 44°C und 4 mM Mg^{++} als auch bei 50°C und 20 mM Mg^{++} durchgeführt werden kann. Während dieses Schritts müssen zusätzlich Proteine zugefügt werden, und es ist wahrscheinlich, daß die S-Wert-Veränderung von 41S ($RI^{*}_{50}(1)$) ⟶ 48S ($RI_{50}(2)$) zum einen auf die feste Bindung der zugegebenen Proteine und andererseits auf eine weitere Konformationsänderung der bereits gebildeten Partikel zurückzuführen ist. Die Bedingungen der ersten Inkubation ermöglichten die Bildung von $RI^{*}_{50}(1)$. Ein vergleichbares Partikel, das wie $RI^{*}_{50}(1)$ mit einem S-Wert von 41S sedimentiert, konnte unter den Bedingungen der zweiten Inkubation (20 mM Mg^{++}/50°C) nicht beobachtet werden, wenn die RNS und TP 50 nicht zuvor bei 44°C und 4 mM inkubiert worden waren. Die erhaltenen Rekonstitutionspartikel waren in diesem Fall inaktiv, was anzeigt, daß $RI^{*}_{50}(1)$ ein notwendiges Zwischenprodukt bei der Rekonstitution der 50S Untereinheit darstellt. $RI_{50}(2)$ enthält alle ribosomalen Komponenten, zeigt jedoch bei Funktionstests keine Aktivität. Für seine Aktivierung benötigt $RI_{50}(2)$ eine zweite Inkubation bei 50°C und 20 mM Mg^{++}.

Die optimalen Bedingungen für die Schritte von $RI_{50}(1)$ ⟶ $RI^{*}_{50}(1)$ und von $RI_{50}(2)$ ⟶ R50S sind verschieden. Darum können 50S Untereinheiten von E.coli Ribosomen nur durch eine zweistufige Inkubation rekonstituiert werden, bei der nach dem ersten Schritt die Mg^{++}-Konzentration von 4 mM auf 20 mM und die Temperatur von 44°C auf 50°C erhöht werden.

Fahnestock et al (1972) beschrieben für die Rekonstitution von ribosomalen 50S Untereinheiten aus B.stearothermophilus zwei Zwischenprodukte, die mit S-Werten von 35S und 43S sedimentieren. Sie erhielten das

35S-Partikel (RI_{50}) nach Inkubation von RNS und Proteinen bei Temperaturen von 30°C und weniger. RI_{50} von B.stearothermophilus ließ sich durch Hitzeaktivierung bei 60°C und 20 mM Mg^{++} in RI^{*}_{50}, ein 43S Partikel, überführen. Wenn RI^{*}_{50} mit Proteinen bei 60°C inkubiert wurde, entstanden Rekonstitutionspartikel, die funktionell aktiv waren, jedoch einen S-Wert von nur 46S hatten. Ihr RI_{50} entspricht dem $RI_{50}(1)$ von E.coli Ribosomen, denn beider Sedimentationsverhalten ist ähnlich (35S bzw. 33S), und sie sind beide vollständig inaktiv bei Funktionstests. Das RI^{*}_{50} Partikel von B.stearothermophilus ist schwer zuzuordnen, weil für E.coli 50S zwei weitere Zwischenprodukte, $RI^{*}_{50}(1)$ und $RI_{50}(2)$, existieren, die nicht wie RI^{*}_{50} sedimentieren (41S bzw. 48S gegenüber 43S) und nicht funktionell aktiv sind, wohingegen RI^{*}_{50} von B.stearothermophilus wenn auch verminderte Aktivität bei der Peptidbindung zeigt. Ihre Rekonstitutionspartikel sedimentieren leichter (46S) als nativen Untereinheiten (50S), was darauf hindeutet, daß die Rekonstitution unter ihren Bedingungen nicht optimal verläuft.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß ein zweistufiges Verfahren auch bei der Rekonstitution von B.stearothermophilus 50S Untereinheiten von Vorteil war (Tabelle XVI). Die hier beschriebenen RI_{50}-Partikel von E.coli sind definierter, denn sie selbst sind funktionell völlig inaktiv (im Gegensatz zu RI^{*}_{50} von B.stearothermophilus), führen aber nach Inkubation zu hoch aktiven und wie 50S sedimentierenden Rekonstitutionspartikeln.

Nomura und Held (1974) beschrieben die Bildung von RI^{*}_{50} aus RI_{50} als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt während der Rekonstitution von B.stearothermophilus 50S Ribosomen. Im Widerspruch dazu zeigen

die Kinetikuntersuchungen der zwei Rekonstitutionsstufen bei der Bildung von E.coli 50S Untereinheiten (Abb. 24-26), daß der Schritt von $RI_{50}(2)$ nach R50S geschwindigkeitsbestimmend ist, denn er benötigt mit Abstand die längste Inkubationszeit bei der höchsten Temperatur (90 Min/50°C).

Die in vitro gefundenen RI_{50} Partikel spiegeln formal die Bildung der ribosomalen 50S Untereinheit von E.coli in vivo wider, wo zwei Vorstufen p_1 50S (32S) und p_2 50S (43S) vorkommen (Schlessinger, 1974). Die in vivo Vorstufen sind wie die RI_{50}-Partikel nicht aktiv bei der Poly(Phe)-Synthese, enthalten 5S RNS und können zu 50S konstituiert werden (Nierhaus, Bordasch & Homann, 1973). Bei einem Vergleich der schwach gebundenen Proteine des $RI_{50}(1)$ mit den der p_1 50S Vorstufe fehlenden Proteinen findet sich jedoch eine nur mäßig gute Übereinstimmung. Nur fünf der acht schwach gebundenen Proteine (L6, L15, L16, L28, L32) waren auf dem p_1 50S nicht enthalten.

Pichon et al (1975) hatten aus dem Erscheinen von radioaktiv markierten Proteinen in reifen Ribosomen eine Reihenfolge des Einbaus der Proteine in vivo beschrieben und die ribosomalen Proteine in früh- und späteingebaute Komponenten geteilt. Keine Übereinstimmung liegt vor zwischen dieser Einteilung und der Gruppe der am $RI_{50}(1)$ schwach gebundenen Proteine. Nur zwei der acht in vitro schwach gebundenen Proteine (L6, L25) gehören zu der Klasse der in vivo späten 50S Proteine.

Der Widerspruch der in vivo und in vitro Befunde verdeutlicht den grundsätzlichen Unterschied des 50S Aufbaus in vivo und in vitro:

Die Untereinheiten werden in vivo, ausgehend von einer Vorstufe der 23S RNS, die untermethyliert ist und mehr Nukleotide enthält als die 23S RNS von reifen Ribosomen, gebildet (Schlessinger, 1974; Nomura und Held, 1974). Sie werden ferner mit Vorstufen von ribosomalen Proteinen, z.B. einem untermethyliertem L11 (Alix & Hayes, 1974) und u.U. mit Hilfe von speziellen Proteinen, die die Bildung des Ribosoms beeinflussen, jedoch nicht in reifen Ribosomen vorkommen, aufgebaut.

Diese Punkte sind wahrscheinlich auch der Grund dafür, daß die Ribosomenbildung in vivo wesentlich geringerer Energien bedarf als in vitro.

Die schwach am $RI_{50}(1)$ gebundenen Proteine können mit den Proteinen, die bei mittleren LiCl-Konzentrationen vom Ribosom abgelöst werden, verglichen werden. Sechs der acht schwach gebundenen Proteine (L6, L15, L16, L25, L27 und L28) befinden sich in der split-Fraktion, wenn 50S Untereinheiten in 1,5 M LiCl Puffer inkubiert werden (Homann & Nierhaus, 1971).

Durch die Präparation von LiCl-core Proteinen und ihre Inkubation mit 23S RNS im ersten Schritt, konnte gezeigt werden, daß nicht alle 18 festgebundenen Proteine für die Konformationsänderung des $RI_{50}(1)$ zum $RI^*_{50}(1)$ Partikel erforderlich sind. Die Inkubation von 23S RNS mit den 10 Proteinen L2, L3, L4, L13, L17, L20, L21, L22, L23 und L29 (4,0c core Proteine) plus L19 und L24 formte ein Partikel, das unter den Bedingungen der partiellen Rekonstitution mit TP 50 und 5S RNS zu aktiven R50S rekonstituiert werden konnte. Dieses Partikel sedimentiert wie das $RI^*_{50}(1)$ Partikel und das 4,0c core, die unter den gleichen Bedingungen aktivierbar sind.

Wie auch aus den Versuchen mit (-5S RNS)-Partikeln zu entnehmen ist, wird die Konformationsänderung in der ersten Stufe von 5S RNS nicht beeinflußt.

Eine besondere Bedeutung hat im ersten Rekonstitutionsschritt Protein L24, dessen alleinige Zugabe zu den 10 anderen Proteinen und der RNS die Konformationsänderung bewirkt, wohingegen die 10 Proteine allein diesen Effekt nicht zeigen. L24 bindet wie 6 der 10 Proteine (L2, L3, L4, L13, L20, L23) direkt an die 23S RNS (Zimmermann, 1974). L24 hat vermutlich mehrere Bindungsstellen an der RNS, deren Zusammenführen durch das Protein eine Faltung der 23S RNS ermöglicht, die im Sucrosegradienten das geänderte Sedimentationsverhalten zur Folge hat. Vergleicht man die 12 Proteine (L2, L3, L4, L13, L17, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L29) mit den in vivo gefundenen Daten von Pichon et al, so sind in den 14 in vivo sehr früh eingebauten Proteinen 11 der 12 Proteine (nicht L2) enthalten, die bei der in vitro Rekonstitution im ersten Schritt notwendig sind. Zehn der zwölf Proteine (außer L2, L19) finden sich auch auf der in vivo gefundenen ribosomalen Vorstufe p_1 50S. Diese Obereinstimmungen können nicht zufällig sein und lassen die Annahme zu, daß in vivo und in vitro Bildung der 50S Untereinheit von E.coli nach gleichen Prinzipien verlaufen. Die Zusammensetzung der im ersten Schritt wichtigen Proteine bestätigt auch die Vorstellung, daß bei dem LiCl-splitting Verfahren die abgewaschenen Proteine die äußere Hülle des Ribosoms und die core-Proteine den inneren Kern der Organelle darstellen. Nur so ist zu erklären, daß gerade die 10 4,0c core-Proteine und L24 in der ersten Stufe mit 23S RNS inkubiert werden müssen, um aktive Untereinheiten zu konstituieren; denn bei der Rekonstitution sollte zunächst der innere Kern des Ribosoms wiederhergestellt werden, an den sich dann die Proteine der äußeren Hülle anlagern.

4.5. 5S RNS-Proteinkomplexe

Die Partikel aus 5S RNS und TP 50 enthalten nach Inkubation bei 0°C überraschenderweise eine große Anzahl von Proteinen: L2, L3, L5, L7, L12, L13, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21, L25 und L28. Darin sind die Proteine L5, L18 und L25, die spezifisch an die 5S RNS binden (Horne & Erdmann, 1972) enthalten; außerdem L2, das mit L5 benachbart ist, sowie L7 und L12, die mit L2 durch bifunktionelle Reagenzien verbunden werden können (Traut et al, 1974) und für die Bindung der die GTP-Spaltung induzierenden Elongationsfaktoren wichtig sind. Da die 5S RNS zu klein ist, um direkt an alle 15 Proteine zu binden, sollten in diesem Komplex starke Protein - Protein Wechselwirkungen auftreten. Diese Wechselwirkungen zwischen den Proteinen der großen 50S Untereinheit waren von Roth & Nierhaus (1975) nach Untersuchungen mit Ribonucleoprotein-Fragmenten beschrieben worden.

Nach der Inkubation bei 44°C befanden sich noch 4 Proteine (L2, L5, L18, L25) auf dem Komplex. Das zweistufig inkubierte Partikel enthielt schließlich nur die Proteine L2, L18, L25 in unverminderten Mengen; bei einer von drei Präparationen L18 und L25, aber kein L2. Dieses Partikel ist mit dem von Horne und Erdmann (1972) beschriebenen E.coli 5S RNS-Protein-Komplex vergleichbar, welcher L18 und L25 und in geringem Maße L5 enthält und ohne Faktoren GTP und ATP spalten kann (Gaunt-Klöpfer & Erdmann, 1975).

4.6. Rekonstitution von 23S RNS mit Proteinen ohne 5S RNS

Wenn 23S RNS allein ohne 5S RNS mit TP 50 inkubiert wurde, enthielten die Partikel nahezu alle ribosomalen Proteine. Das Protein L25 ist nach Ultrazentrifugation auf keinem der Partikel zu bestimmen, auf PEG-gefälltem Partikel ist L25 jeweils in verminderter Menge enthalten. Wenn 23S RNS und TP 50 bei $0^{o}C$ inkubiert wurden, ist das Protein L5 vorhanden, nach zweistufiger Inkubation wird L5 jedoch wie L16 und L18 bei der Zentrifugation durch Sucrose abgetrennt. Die Proteine L5, L18 und L25 haben Bindungsstellen an der 5S RNS (Yu & Wittmann, 1973); für ihre feste Bindung an das Ribosom ist 5S RNS erforderlich. Die Proteine L 6, L27, L28, L30 und L32 sind nur nach zweistufiger Inkubation nicht durch Ultrazentrifugation abzuwaschen, dies steht in Übereinstimmung mit ihrer Zugehörigkeit zu den schwach am $RI_{50}(1)$ gebundenen Proteinen.

4.7. Bedeutung von 5S RNS für die Bildung der 50S Partikel und für ribosomale Funktionen

Auf verschiedene Arten war es gelungen, ribosomale Partikel zu gewinnen, die keine 5S RNS enthielten. Siddiqui und Hosokawa (1969) entzogen 50S Ribosomen die Mg^{++}-Ionen mit Komplexbildnern und konnten Partikel darstellen, die keine 5S RNS enthielten und bei der t-RNS Bindung nicht aktiv waren. Erdmann et al (1971) beschrieben Partikel, die sie durch Rekonstitution von 23S RNS und Proteinen der 50S Untereinheit von Bacillus stearothermophilus gewannen.

Diese (-5S RNS)-Partikel zeigten stark verminderte Aktivitäten (0-25 % von (+5S RNS)-Partikeln)in ribosomalen Funktionstests, woraus sie folgerten, daß 5S RNS ein essentieller Bestandteil des Ribosoms ist. Den (-5S RNS)-Partikeln fehlten jedoch außer 5S RNS auch einige ribosomale Proteine, was eine eindeutige Zuordnung der Inaktivität zu der fehlenden 5S RNS bzw. den Proteinen nicht zuließ.

Die Totalrekonstitution der 50S Untereinheit von E.coli Ribosomen ermöglichte die Synthese von (-5S RNS)-Partikeln, die je nach Isolationsmethode alle ribosomalen Proteine enthielten (PEG-Fällung) oder nach Ultrazentrifugation die schwach gebundenen Proteine L5, L16, L18 und L25 verloren hatten (Tabelle XVIII; Abb. 34). Die Poly(Phe)-Syntheseaktivitäten beider (-5S RNS)-Partikel waren erheblich reduziert (Tabellen XX und XXIII), aber in beiden Fällen signifikant (10-20 % von nativen 50S).

Das Fehlen von 5S RNS verminderte die Peptidbindungsfähigkeit, auch wenn alle ribosomalen Proteine vorhanden waren. Inkubiert man das PEG-gefällte (-5S RNS)-Partikel bei 50°C und 20 mM Mg Ac allein in Gegenwart von 5S RNS, so kann die kleine RNS inkorporiert werden, und die Partikel können Poly(Phe) synthetisieren (Tabelle XX). Bei geringeren Temperaturen als 40°C war der nachträgliche Einbau von 5S RNS nicht möglich. Die (-5S RNS)-Partikel zeigten ein ähnliches Sedimentationsverhalten wie die $RI_{50}(2)$ Partikel (47S bzw. 48S). Unter den Bedingungen der partiellen Rekonstitution konnten beide Partikel in aktive R50S umgewandelt werden, die 47S Partikel bei Zusatz von 5S RNS und die 48S Partikel, die 5S RNS enthielten, ohne weitere RNS-Zugabe. Die Konformationsänderung der Partikel von 47S bzw. 48S nach 50S in der zweiten Stufe der Totalrekonstitution erfordert somit das Vor-

handensein von 5S RNS, im Gegensatz zur Bildung von $RI^*_{50}(1)$ (42S) aus $RI_{50}(1)$ (33S) im ersten Rekonstitutionsschritt.

Um die Rolle der 5S RNS für die ribosomale Funktion näher zu charakterisieren, wurden die (-5S RNS)-Partikel im Vergleich zu R50S (rekonstituierte (+5S RNS)-Partikel)und nativen 50S Untereinheiten verschiedenen Tests auf ribosomale Partialfunktionen unterworfen.

Wie bei der Poly(Phe)-Synthese zeigten die (-5S RNS)-Partikel auch bei der Proteinsynthese mit natürlicher messenger-RNS (R17-Ansatz) deutliche Aktivität, etwa 20 % von R50S. Dieses Ergebnis wurde auch im Versuch mit RNS-freien S150 DEAE Enzymen erzielt. Die Partikel konnten, obwohl vermindert, enzymatisch Polypeptide synthetisieren, bei dem Test auf nichtenzymatische Translation waren die (-5S RNS)-Partikel hingegen nicht aktiv. Die Prüfung der Fähigkeit der Partikel, t-RNS zu binden, führte zu verschiedenen Ergebnissen. Die (-5S RNS)-Partikel konnten enzymatisch mit EF-T keine Phe-t-RNS binden (< 5 % Aktivität von R50S), wohingegen sie bei der IF-abhängigen Ac-Phe-t-RNS Bindung deutliche Aktivität zeigten (25-30 %).

Durch Tetracyclin-Hemmkurven konnten die Bindungen in die ribosomale A- bzw. P-site qualitativ unterschieden werden. Die A-site-Bindung war durch das Fehlen von 5S RNS wesentlich stärker beeinträchtigt als die P-site-Bindung, woraus zu schließen ist, daß 5S RNS insbesondere an der enzymatischen Bindung in die A-site beteiligt ist. Gleiche Ergebnisse wurden auch mit PEG-gefällten (-5S RNS)-Partikeln erzielt; die verminderten Bindungsaktivitäten sind daher auf das Fehlen von 5S RNS und nicht der Proteine L5, L18 und L25 zurückzuführen.

Dieser Befund steht im Einklang mit der Hypothese von Forget und Weißmann (1967), die die Beteiligung von 5S RNS an der t-RNS Bindung über Wasserstoffbrückenbindungen einer CGAAC-Sequenz der 5S RNS mit der TΨCG-Schleife der t-RNS diskutiert hatten. Dieses CGAAC-Oligonukleotid wurde in allen sequenzierten 5S RNS aus Prokaryonten gefunden, wie auch nahezu alle t-RNS Arten die Sequenz TΨCG enthalten. Erdmann et al (1973) konnten ferner zeigen, daß das Oligonukleotid TΨC spezifisch an 5S RNS bindet.

Die nichtenzymatische Phe-t-RNS-Bindung der (-5S RNS)-Partikel ist ebenfalls reduziert (10-24 % Aktivität von R50S), sie erlaubt jedoch keine Differenzierung zwischen ribosomaler A- und P-site.

Bei den Tests unter Alkoholbedingungen zeigten die (-5S RNS)-Partikel volle Aktivität in Ac-Leucyl-t-RNS- und Leucyl-t-RNS-Bindung. Äthanol entfaltet das Ribosom (Voigt & Parmeggiani, 1973). Unter diesen Bedingungen spielt 5S RNS offensichtlich keine Rolle bei der t-RNS-Bindung.

Die Peptidyltransferase war jedoch sowohl unter Alkoholbedingungen (z.B. Fragment-Test) als auch mit enzymatisch gebundener Ac-Phe-t-RNS durch das Fehlen von 5S RNS stark gehemmt. Obwohl rund 90 % Ac-Leucyl-t-RNS bzw. 25 % Ac-Phe-t-RNS gebunden werden konnten, war die Puromycin-Reaktion sehr gering (~10 % von R50S). Das Peptidyltransferasezentrum ist offensichtlich ohne 5S RNS stark deformiert; denn auch bei der Bindung von Chloramphenicol und dem Fragment CACCA-Leu-Ac, die in A- bzw. P-site-Hälfte des Zentrums binden (Dietrich et al, 1974; Nierhaus & Nierhaus, 1973) waren die (-5S RNS)-Partikel nicht aktiv (4 % bzw. keine Bindung im Vergleich zu R50S).

Oberraschenderweise konnten die (-5S RNS)-Partikel GTP enzymatisch mit EF-G spalten. Die Kinetikstudie verdeutlicht, daß (-5S RNS)-Partikel nur geringfügig weniger GTP hydrolysieren als R50S oder native 50S Untereinheiten. Auch Erdmann et al (1971) hatten die höchste Aktivität der (-5S RNS)-Partikel von B.stearothermophilus bei der EF-G abhängigen GTP-Bindung beschrieben (~25 %). Sander et al (1975) konnten zeigen, daß CsCl-cores , die wie die (-5S RNS)-Partikel kein L5, L18 und L25 enthielten, mit L7/12 die GTPase-Reaktion induzierten. Ihre rekonstituierten cores enthielten wie das (-5S RNS)-Partikel die Proteine L7 und L12, die für die Bindung der Elongationsfaktoren an das Ribosom erforderlich sind.

5S RNS und vermutlich auch die Proteine L5, L18 und L25, die als 5S RNS-Proteinkomplex nichtenzymatisch GTP spalten können (Horne & Erdmann, 1973), scheinen bei der enzymatischen GTPase-Reaktion nicht von großer Bedeutung zu sein.

Die Untersuchungen lassen erkennen, wie mit Hilfe der Totalrekonstitution ribosomale Struktur und Funktion korreliert werden können. Die durch zweistufige Inkubation aus isolierten 23S RNS, 5S RNS und Proteinen gewonnenen R50S Partikel zeigen wie die nativen Untereinheiten volle Aktivitäten in vielen ribosomalen Funktionstests. Wird bei der Rekonstitution eines der bekannten Strukturelemente des Ribosoms (z.B. ein Protein oder - wie in diesem Falle - 5S RNS) fortgelassen, zeigen die Partikel veränderte Aktivitäten. Bei besonders starker Aktivitätsverminderung kann die Bedeutung der fehlenden Komponente für die untersuchte Reaktion erkannt werden (z. B. Bedeutung der 5S RNS für die EF-T abhängige Aminoacyl-t-RNS-Bindung). Bleibt das Weglassen ohne Effekt, so ist dieses Strukturele-

ment wahrscheinlich gar nicht oder nur wenig an der getesteten Teilfunktion beteiligt (z.B. zeigen (-5S RNS)-Partikel volle GTPase-Aktivität). Die Totalrekonstitution eröffnet damit einen Weg für ein besseres Verständnis von Struktur- und Funktionsbeziehungen innerhalb der großen Untereinheit von Bakterien-Ribosomen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die die Totalrekonstitution der ribosomalen 50S Untereinheit von E.coli aus seinen molekularen Komponenten ermöglicht.

Unter den Bedingungen der partiellen Rekonstitution wurden core-Partikel, die weniger als ein Drittel der ribosomalen Proteine und 23S RNS, jedoch keine 5S RNS, enthielten, mit komplementären split-Proteinen und 5S RNS zu 50S Partikeln rekonstituiert. In einem einstufigen Verfahren, bei dem während der Inkubation weder die Temperatur noch die Pufferbedingungen verändert wurden, konnten aus 23S RNS, 5S RNS und Proteinen ribosomale Partikel wiederhergestellt werden, die jedoch zerstörte 23S RNS hatten und nur weniger als 1/10 der Peptidbindungsaktivität von nativen Untereinheiten erreichten. Eine Optimierung der einstufigen Inkubation steigerte die Aktivität der rekonstituierten Partikel nur unwesentlich.

Mittels einer zweistufigen Inkubation, bei der nach einem 20minütigen ersten Schritt die Mg^{++}-Ionenkonzentration von 4 auf 20 mM und die Temperatur von $44^{o}C$ auf $50^{o}C$ erhöht wurden, und bei der für weitere 90 Minuten inkubiert wurde, gelang die Totalrekonstitution zu voll aktiven 50S Untereinheiten. Die rekonstituierten 50S Partikel (R50S) enthielten unzerstörte 23S RNS, 5S RNS und alle ribosomalen Proteine. Sie sedimentierten mit einem S-Wert von 50S und zeigten bei allen untersuchten ribosomalen Funktionen vergleichbare Aktivitäten wie native 50S Untereinheiten.

Diese Technik war bei der Totalrekonstitution von 50S Untereinheiten aus verschiedenen E.coli Stämmen anwendbar und erwies sich auch bei 50S Untereinheiten aus Bacillus stearothermophilus als vorteilhaft.

Die Aktivität der rekonstituierten Partikel war abhängig vom Erntepunkt der Bakterien. Während der semilogarithmischen Wachstumsphase der Zellen haftete eine Ribonuclease an den Ribosomen, die die 23S RNS bei der Rekonstitution zerstörte. Die RNase konnte durch Waschen in LiCl-Puffer von den Untereinheiten entfernt werden.

Der Vorgang des in vitro Aufbaus des 50S Partikels wurde analysiert. Die Rekonstitution zu 50S verläuft über drei Zwischenprodukte ($RI_{50}(1)$, $RI^{*}_{50}(1)$, $RI_{50}(2)$), die isoliert und charakterisiert wurden. Die RI_{50}-Partikel wurden mit anderen in vitro und in vivo gefundenen 50S-Vorstufen verglichen.

Schließlich wurden Partikel hergestellt, die nur aus einer der zwei RNS-Spezies, 23S RNS oder 5S RNS, und Proteinen bestanden. Die Auswertung der Aktivitäten der (-5S RNS)-Partikel ließ die Bedeutung der 5S RNS für die ribosomalen Teilfunktionen erkennen. Die 5S RNS ist bei der EF-T abhängigen t-RNS-Bindung in die A-site des Ribosoms beteiligt; bei der IF abhängigen P-site Bindung ist 5S RNS entbehrlich, und bei der EF-G abhängigen GTP Spaltung spielt 5S RNS keine Rolle.

LITERATURVERZEICHNIS

Alix, J.-H./Hayes, D.: (1974) Properties of Ribosomes and RNA Synthesized by Escherichia coli Grown in the Presence of Ethionine, J.Mol.Biol. 86, 139-159

Ballesta, J.P.G. (1974): Elongation Factor T-Dependent GTP Hydrolysis: Dissociation from Aminoacyl-t-RNA Binding, Methods in Enzymology 30, 232-235

Brownlee, G.G./ Sanger, F./ Barrell, B.G. (1968): The Sequence of 5S Ribosomal Ribonucleic Acid, J.Mol.Biol. 34, 379-412

Ceri, H./Maeba, P.Y.: (1973) Association of a Ribonuclease with the 50S Ribosomal Subunit of Escherichia coli MRE 600, Biochim.Biophys. Acta 312, 337-348

Chu, F.K./Maeba, P.Y.: (1973) Physical Reconstitution of 23S RNA - 50S Protein Complexes from Escherichia coli, Can.J.Biochem. 51, 129-139

Dietrich, S./Schrandt, I./Nierhaus, K.H.(1974): Interdependence of E.coli Ribosomal Proteins at the Peptidyltransferase Centre, FEBS Letters 47, 136-139

Ehresmann, C./Stiegler, P./Mackie, G.A./Zimmermann, R.A./Ebel, J.P./ Fellner, P. (1975): Primary sequence of the 16S Ribosomal RNA of Escherichia coli, Nucl.Acids Research 2, 265-302

Erdmann, V.A./Fahnestock, S./Higo, K./ Nomura, M. (1971): Role of 5S RNA in the Functions of 50S Ribosomal Subunits, Proc.Nat.Acad.Sci. 68, 2932-2936

Erdmann, V.A./Sprinzl, M./ Pongs, O. (1973): The Involvement of 5S RNA in the Binding of t-RNA to Ribosomes, Biochem.Biophys.Res. Comm. 54, 942-948

Expert-Besançon, A./ Guêrin, M.-F./Hayes, D.H./ Legault, L./Thibault, J. (1974): Preparation of E.coli ribosomal subunits without loss of biological activity, Biochimie 56, 77-89

Fahnestock, S./Held, W./ Nomura, M. (1972): The Assembly of Bacterial Ribosomes, in: The First John Innes Symposium on Generation of Subcellular Structures, ed.R.Markham et al, 179-217

Forget, B.G./Weissmann, S.M.(1967): Nucleotide Sequence of KB Cell 5S RNA, Science 158, 1695-1699

Funatsu, G./Nierhaus, K.H./Wittmann-Liebold, B. (1972): Ribosomal Proteins XXII. Studies on the Altered Protein S5 from a Spectinomycin-resistant Mutant of Escherichia coli, J.Mol.Biol. 64, 201-209

Funatsu, G./Wittmann, H.G. (1972): Ribosomal Proteins XXIII. Location of Amino-acid Replacements in Protein S12 from Escherichia coli Mutants Resistant to Streptomycin, J.Mol.Biol. 68, 547-550

Gaunt-Klöpfer, M./ Erdmann, V.A. (1975): ATPase and GTPase Activities Associated with the 5S RNA-Protein Complex of Escherichia coli Ribosomes, Biochim. Biophys. Acta 390, 226-230

Gesteland, R.F. (1966): Isolation and Characterization of Ribonuclease I Mutants of Escherichia coli, J.Mol.Biol. 16, 67-84

Hardy, S.J.S./Kurland, C.G./Voynow, P./Mora, G. (1969): The Ribosomal Proteins of Escherichia coli. I. Purification of the 30S Ribosomal Proteins, Biochemistry 8, 2897-2905

Hernandez, F./Vazques, D./Ballesta, J.P.G.: (1975) Partial Reconstitution of Active Ribosomes and 50S Subunits, Biochemistry 14, 1503-1508

Highland, J.H./Bodley, J.W./Gordon, J./Hasenbank, R./Stöffler, G.: (1973) Identity of the Ribosomal Proteins Involved in the Interaction with Elongation Factor G, Proc.Nat.Acad. Sci. 70, 147-150

Hindennach, I./Kaltschmidt, E./Wittmann, H.G. (1971): Ribosomal Proteins. Isolation of Proteins from 50S Ribosomal Subunits of Escherichia coli, Eur.J.Biochem. 23, 12-16

Homann, H.E./Nierhaus, K.H. (1971): Ribosomal Proteins. Protein Compositions of Biosynthetic Precursors and Artificial Subparticles from Ribosomal Subunits in Escherichia coli K12, Eur.J.Biochem. 20, 249-257

Horne, J.R./Erdmann, V.A. (1972): Isolation and Characterization of 5S RNA-Protein Complexes from Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli Ribosomes, Mol.Gen.Genet. 119, 337-344

Horne, J.R./Erdmann, V.A. (1973): ATPase and GTPase Activities Associated with a specific 5S RNA-Protein Complex, Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 2870-2873

Hosokawa, K./Kiho, Y./ Migita, L.K. (1973): Assembly of Escherichia coli 50S Ribosomes from Ribonucleic Acid and Protein Components, J.Biol.Chem. 248, 4135-4143

Jordan, B.R.: (1971) Studies on 5S RNA Conformation by Partial Ribonuclease Hydrolysis, J.Mol.Biol. 55, 423-439

Kaltschmidt, E./Wittmann, H.G. (1970): Ribosomal Proteins. VII. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins, Anal.Biochem. 36, 401-412

Kreider, G./Brownstein, B.L. (1971): A Mutation Suppressing Streptomycin Dependence II. An Altered Protein on the 30S Ribosomal Subunit, J.Mol. Biol. 61, 135-142

Marcot-Queiroz, J./ Monier, R. (1967): Les Ribosomes d'Escherichia coli. II. - Préparation de Particules 18S et 25S par Traitement des Ribosomes au Chlorure de Lithium, Bull. Soc.Chim.Biol. 49, 477-494

Maruta, H./Tschuiya, T./Mizuno, D. (1971): In vitro Reassembly of Functionally Active 50S Ribosomal Particles from Ribosomal Proteins and RNA's of Escherichia coli, J.Mol.Biol. 61, 123-134

Mc Ewen, C.R. (1967): Tables for Estimating Sedimentation through Linear Concentration Gradients of Sucrose Solution, Anal.Biochem. 20, 114-149

Michaelis, L. (1931): Der Acetat-Veronal-Puffer, Biochem.Z. 234, 139-141

Mizushima, S./Nomura, M. (1970): Assembly Mapping of 30S Ribosomal Proteins from E. coli, Nature 226, 1214-1218

Monro, R.E. (1971): Ribosomal Peptidyltransferase: The Fragment Reaction, Methods in Enzymology 20, 472-481

Moore, V.G./Atchison, R.E./Thomas, G./Moran, M./Noller, H.F.: (1975) Identification of a Ribosomal Protein Essential for Peptidyl Transferase Activity, Proc.Nat.Acad.Sci. 72, 844-848

Nierhaus, D./Nierhaus, K.H. (1973): Identification of the Chloramphenicol-Binding Protein in Escherichia coli Ribosomes by Partial Reconstitution, Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 2224-2228

Nierhaus, K.H./Bordasch, K./Homann, H.E.: (1973) Ribosomal Proteins XLIII. In vivo Assembly of Escherichia coli Ribosomal Proteins, J.Mol.Biol. 74, 587-597

Nierhaus, K.H./Montejo, V. (1973): A Protein Involved in the Peptidyltransferase Activity of Escherichia coli Ribosomes, Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 1931-1935

Nirenberg, M./Leder, P.: (1964) RNA Codewords and Protein Synthesis. The Effect of Trinucleotides upon the Binding of sRNA to Ribosomes, Science 145, 1399-1407

Nirenberg, M./Matthaei, J.H. (1961): The Dependence of Cell-Free Protein Synthesis in E.coli Upon Naturally Occurring or Synthetic Polyribonucleotides, Proc.Nat.Acad.Sci. 47, 1588-1602

Nomura, M. (1973): Assembly of Bacterial Ribosomes. In vitro reconstitution systems facilitate study of ribosome structure, function and assembly, Science 179, 864-873

Nomura, M./Erdmann, V.A. (1970): Reconstitution of 50S Ribosomal Subunits from Dissociated Molecular Components, Nature 228, 744-748

Nomura, M./Held, W.A.: (1974) Reconstitution of Ribosomes: Studies on Ribosome Structure, Function and Assembly, in: Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Monograph Series, 193-223

Nomura, M./Mizushima, S./Ozaki, M./Traub, P./ Lowry, C.V. (1969): Structur and Function of Ribosomes and their Molecular Components, Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 34, 49-61

Ozaki, M./Mizushima, S./Nomura, M. (1969): Identification and Functional Characterization of the Protein controlled by the Streptomycin-resistant Locus in E.coli, Nature 222, 333-339

Parmeggiani, A./Singer, C./Gottschalk, E.M. (1971): Purification of the Amino Acid Polymerization Factors from Escherichia coli, Methods in Enzymology 20, 291-302

Pestka, S. (1968): Studies on the Formation of Transfer Ribonucleic Acid-Ribosome Complexes. IV. A New Assay for Codon Recognition and Interaction of Transfer Ribonucleic Acid with 50S Subunits, J.Biol. Chem. 243, 4038-4044

ders. (1969): Studies on the Formation of Transfer Ribonucleic Acid-Ribosome Complexes. VI. Oligopeptide Synthesis and Translocation on Ribosomes in the Presence and Absence of Soluble Transfer Factors, J.Biol.Chem. 244, 1533-1539

Pichon, J./Marvaldi, J./Marchis-Mouren, G.: (1975) The In Vivo Order of Protein Addition in the Course of Escherichia coli 30S and 50S Subunit Biogenesis, J.Mol.Biol. 96, 125-137

Randall-Hazelbauer, L.L./Kurland, C.G.: (1972) Identification of Three 30S Proteins Contributing to the Ribosomal A-Site, Molec.Gen.Genetics 115, 234-242

Roth, H.: (1974) Isolierung und Charakterisierung von Ribonucleoproteinfragmenten aus Ribosomen von Escherichia coli, Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin

Roth, H.E./Nierhaus, K.H. (1975): Structural and Functional Studies of Ribonucleoprotein Fragments Isolated from Escherichia coli 50S Ribosomal Subunits, J.Mol.Biol. 94, 111-121

Sander, G./Marsh, R.C./ Voigt, J./Parmeggiani, A. (1975): A Comparative Study of the 50S Ribosomal Subunit and Several 50S Subparticles in EF-T- and EF-G-Dependent Aktivities, Biochemistry 14, 1805-1814

Schlessinger, D.: (1974) Ribosome Formation in Escherichia coli, in: Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Monograph Series, 393-416

Siddiqui, M.A.Q./ Hosokawa, K.: (1969) Role of 5S Ribosomal RNA in Polypeptide Synthesis, Biochem.Biophys.Res.Comm. 36, 711-720

Staehelin, T./Meselson, M.: (1966) In vitro Recovery of Ribosomes and of Synthetic Activity from Synthetically Inactive Ribosomal Subunits, J.Mol.Biol. 16, 245-249

Staehelin, T./Maglott, D./Monro, R.E.: (1969) On the Catalytic Center of Peptidyl Transfer: A Part of the 50S Ribosome Structure, Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol. 34, 39-48

Traub, P./Nomura, M.: (1968) Structure and Function of E.coli Ribosomes. V. Reconstitution of Functionally Active 30S Ribosomal Particles from RNA and Proteins, Proc.Nat.Acad.Sci. 59, 777-784

Traut, R.R./Heimark, R.L./Sun, T.-T./ Hershey, J.W.B./Bollen, A.: (1974) Protein Topography of Ribosomal Subunit from Escherichia coli, in: Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Monograph Series, 271-308

van Diggelen, O.P./ Bosch, L.: (1973) The Association of Ribosomal Subunits of Escherichia coli 1. Two Types of Association Products Differing in their Apparent Sedimentation Coefficient, Eur.J.Biochem. 39, 499-510

Voigt, J./Parmeggiani, A. (1973): Action of Methanol on the Assoziation of Ribosomal Subunits and Its Effect on the GTPase Activity of Elongation Factor G, Biochem. Biophys.Res.Comm. 52, 811-818

Wittmann, H.G.: (1974) Purification and Identification of Escherichia coli Ribosomal Proteins, in: Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Monograph Series, 93-114

Wittmann, H.G./Wittmann-Liebold, B.: (1974) Chemical Structure of Bacterial Ribosomal Proteins, in: Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Monograph Series, 115-140

Wrede, P./Erdmann, V.A. (1973): Activities of B.stearothermophilus 50S Ribosomes Reconstituted with Prokaryotic and Eukaryotic 5S RNA, FEBS Letters 33, 315-319

Yu, R.S.T./Wittmann, H.G. (1973): The Structural Basis for Functionally Inactivity of Reconstituted 50S Ribosomal Subunits of Escherichia coli, Biochim.Biophys. Acta 319, 388-400

Zagorska, L./Dondon, J./Lelong, J.C./Gros, F./Grunberg-Manago, M. (1971): Decoding site of initiator transfer RNA, Biochimie 53, 63-70

Zimmermann, R.A.: (1974) RNA-Protein Interactions in the Ribosome, in: Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Monograph Series, 225-269

Anmerkungen:

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Abt. Wittmann, in Berlin-Dahlem angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Knud H. Nierhaus für Anregung und Förderung dieser Arbeit.

Ich danke ferner Frau Antje Kollak für ihre stete Hilfsbereitschaft und den Herren Otto Bahn und Detlev Kamp für die technische Unterstützung bei der Zonalzentrifugation und der 2D-Gelelektrophorese.

LEBENSLAUF

Name, Vorname:	Dohme, Ferdinand
geb. am:	16. April 1952
in:	Göttingen
Eltern:	Ferdinand Dohme, Helene Dohme geb. Söhlke
Beruf des Vaters:	Landwirt
Wohnort bis 1970:	Höfingen bei Hameln/Weser
Wohnort ab 1971:	Berlin 33, Clayallee 182
Schulausbildung:	Grundschule Höfingen ab 1958; Math.-Naturw. Schiller-Gymnasium, 1962-1970; Reifeprüfung: Mai 1970
Studium:	Freie Universität Berlin, Fachbereich: Biologie (ab Wintersemester 1970/71)
Studienprüfung:	Vordiplom-Prüfung: 1972

Seit November 1973 arbeite ich am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Abt. Wittmann, in Berlin-Dahlem auf dem Gebiet der Ribosomen-Forschung.

Mit der Promotion möchte ich mein Studium abschließen.

Berlin, 17-Januar-1976

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30